

Rec'd PCT/PTO 28 JUN 2004

PCT/JP 02/13443

24.12.02

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

2001年12月26日

REC'D 21 FEB 2003
PCT

出願番号

Application Number:

特願2001-395487

[ST.10/C]:

[JP2001-395487]

出願人

Applicant(s):

独立行政法人産業技術総合研究所

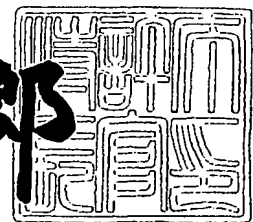
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3004117

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 220-01329

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

 【氏名】 高木 優

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

 【氏名】 平津 圭一郎

【特許出願人】

 【識別番号】 301021533

 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

 【代表者】 吉川 弘之

 【電話番号】 0298-61-3280

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 転写抑制遺伝子及びペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記式 I で表されるアミノ酸配列をコードする遺伝子。

$X - \text{Leu} - \text{Asp} - \text{Leu} - Y - \text{Leu} - Z \quad \dots (I)$

(但し式中、X は 0 ～ 10 個のアミノ酸残基を表し、Y はアスパラギンまたはグルタミン酸を表し、Z は少なくとも 5 個のアミノ酸残基を表す。)

【請求項 2】 請求項 1 に記載の遺伝子を転写因子をコードする遺伝子に結合せしめたキメラ遺伝子。

【請求項 3】 請求項 2 に記載のキメラ遺伝子を有する組み換えベクター。

【請求項 4】 請求項 3 に記載の組み換えベクターを含む形質転換体。

【請求項 5】 請求項 3 に記載の組み換えベクターを含む植物。

【請求項 6】 下記式 I で表されるアミノ酸配列を有するペプチド。

$X - \text{Leu} - \text{Asp} - \text{Leu} - Y - \text{Leu} - Z \quad \dots (I)$

(但し式中、X は 0 ～ 10 個のアミノ酸残基を表し、Y はアスパラギンまたはグルタミン酸を表し、Z は少なくとも 5 個のアミノ酸残基を表す。)

【請求項 7】 請求項 6 に記載のペプチドと転写因子とが結合しているキメラタンパク質。

【請求項 8】 産生される転写因子の機能を転写抑制機能に変換するために用いる請求項 1 に記載の遺伝子。

【請求項 9】 転写因子の機能を転写抑制因子に変換するために用いる請求項 6 に記載のペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、転写因子を転写抑制因子に変換するためのペプチドまたはタンパク質、該ペプチドと転写因子が融合した転写抑制機能を有するタンパク質、上記ペプチドまたは蛋白質をコードする遺伝子、該転写抑制機能を有する蛋白質をコードする遺伝子を含む組換えベクター、及び該組換えベクターを含む形質

転換体に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

生体遺伝子の mRNA への転写を抑制あるいは該遺伝子の発現を抑制する手段として、従来、例えば、アンチセンス法あるいはリボザイム法が知られており、これらの使用は、例えば、発癌遺伝子等疾病の原因となる遺伝子の発現の抑制あるいは植物の改良等において研究が進められているが、アンチセンス法においては、転写を抑制しようとする標的遺伝子あるいはこれを転写した mRNA 等の特定部位と相補的なアンチセンス DNA あるいは RNA を使用するものであり、調製されたアンチセンス DNA あるいは RNA は該標的遺伝子以外の他の遺伝子の発現抑制には使用できず、新たな標的遺伝子の配列にあわせてアンチセンス DNA あるいは RNA を調製する必要があった。

【 0 0 0 3 】

また、リボザイム法も同様に、標的 DNA あるいは mRNA をリボザイムにより切断するには、該標的 DNA あるいは mRNA と結合するための相補的な配列を有し、かつ所定位置で切断可能なようにリボザイムを設計する必要があった。さらに標的を切断するように設計されたりボザイムであっても、例えば、これを、カリフラワーモザイクウイルスの 3' 5' S プロモーター等のプロモーター及び転写終結配列に連結して導入ベクターを構築し、実際に、植物細胞中に導入する場合において、転写されたりボザイムに余分な配列が付加されリボザイム活性が失われる場合があった。また、これらの従来技術においては、当然のことながら標的遺伝子の特定、塩基配列の決定が不可欠となっていた。このほか、遺伝子ノックアウト法により、遺伝子の発現を抑える方法もあるが、この方法によっては例えば複 2 倍体植物においては適用ができなかった。

【 0 0 0 4 】

一方、上記従来技術とは全く別のアプローチとして、本発明者等は、シロイヌナズナ由来の AtERF4 タンパク質を転写因子に結合せしめたタンパク質が遺伝子の転写を顕著に抑制するとの知見を得、該 AtERF4 タンパク質をコードする遺伝子及びこれから切り出した DNA を含むエフェクタープラスミドを構築

した。これを植物細胞に導入してすることにより、実際に遺伝子の転写を抑制することに成功し、これに基づき、これら蛋白質、ペプチド及びこれらをコードする遺伝子等について先に特許出願している（特願2000-109765（特開2001-29277公報）。さらに、本発明者等は研究を進め、C l a s s I I E R F (ethylen Responsive element binding factor) 遺伝子群の一つであるタバコERF3、シロイヌナズナAtERF3、イネOsERF3タンパク質をコードする遺伝子、及びZnフィンガータンパク (Zinc Finger Protein) の遺伝子群の一つであるシロイヌナズナZAT10、同ZAT11をコードする遺伝子について、上記と同様な試験を行ったところ、遺伝子の転写を抑制することを見いだしている。そして、これら遺伝子には、その塩基配列はまちまちではあるが、この遺伝子がコードするタンパク質あるいはペプチドには、すなわち、(L/F)DLN(L/F)(X)Pなる共通のモチーフ（但し、Xは、任意のアミノ酸残基を表す。）が存在することを明らかにしている（「The Plant Cell」Vol.13, 1959-1968 August 2001）。

【0005】

また、本発明者等は、上記タンパク質またはペプチドとは別異のモチーフすなわちLDLELなる配列を有するシロイヌナズナSUPERMANタンパク質を転写因子と結合せしめたとき、該因子の機能を顕著に転写抑制機能に変換するとの知見を得て、このタンパク質またはペプチド、あるいはこれらをコードする遺伝子等に関して本出願と同日付けで出願している。このシロイヌナズナSUPERMAN遺伝子及び上記タバコERF3遺伝子を用いた、植物における転写抑制試験について、それぞれ参考例1および2に挙げる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、上記従来技術のアンチセンス法あるいはリボザイム法等にみられる標的遺伝子の塩基配列に合わせて、その都度DNAあるいはRNAの設計を行う必要なく、簡便でかつ広く適用可能な遺伝子の転写抑制手段を提供することにあり、また、本発明者等の上記転写抑制タンパク質またはペプチドについての研究をさらに進めて、遺伝子の転写抑制を行う場合において、実際に必要とな

る最も基本的なアミノ酸配列部分を確定し、遺伝子の転写抑制をさらに簡便に行うためのペプチド及びその遺伝子を提供しようとするものである。

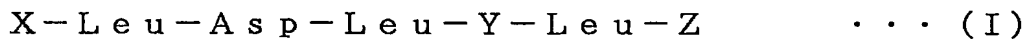
【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上記課題を解決するため、鋭意研究の結果、遺伝子の転写を抑制するペプチドまたはその遺伝子は極めて単純な構造であってもよく、これら単純な構造を有するペプチドまたは遺伝子が、転写活性化因子の機能を顕著に転写抑制機能に変換し得るという驚くべき発見をし、本発明を完成させるに至ったものである。すなわち、本発明は以下のものである。

【0008】

(1) 下記式 I で表されるアミノ酸配列をコードする遺伝子。



(但し式中、Xは0～10個のアミノ酸残基を表し、Yはアスパラギンまたはグルタミン酸を表し、Zは少なくとも5個のアミノ酸残基を表す。)

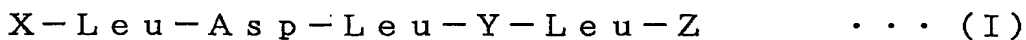
(2) 上記(1)に記載の遺伝子を転写因子をコードする遺伝子に結合せしめたキメラ遺伝子。

(3) (2)に記載のキメラ遺伝子を有する組み換えベクター。

(4) (3)に記載の組み換えベクターを含む形質転換体。

(5) (3)に記載の組み換えベクターを含む植物。

(6) 下記式 I で表されるアミノ酸配列を有するペプチド。



(但し式中、Xは0～10個のアミノ酸残基を表し、Yはアスパラギンまたはグルタミン酸を表し、Zは少なくとも5個のアミノ酸残基を表す。)

(7) (6)に記載のペプチドと転写因子とが結合しているキメラタンパク質。

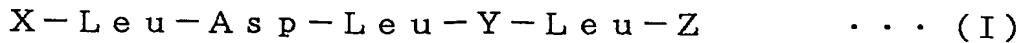
(8) 産生される転写因子の機能を転写抑制機能に変換するために用いる(1)に記載の遺伝子。

(9) 転写因子の機能を転写抑制因子に変換するために用いる(6)に記載のペプチド。

【0009】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明において、遺伝子の転写を抑制するために用いる遺伝子は、下記式（I）に示すアミノ酸配列をコードするものであればよく、その塩基配列自体はどのようなものであってもよい。



本発明においては、この式（I）の遺伝子を転写因子に結合せしめ、このキメラ遺伝子を含む組み換えベクターを用いて形質転換体を得る。この形質転換体においては該キメラ遺伝子に対応するキメラタンパク質が生成され、このキメラタンパク質における転写因子由来のDNA結合領域が標的遺伝子と結合するが、この場合においては、転写因子の機能は、逆に転写抑制機能に変換され、該標的遺伝子の転写は抑制され、標的遺伝子の発現は起こらない。

【0010】

本発明における上記キメラタンパク質による転写抑制機能は遺伝子の種類を問わず作用するが、上記したように、本発明のキメラタンパク質の転写抑制機能は標的遺伝子との結合が必要であるから、本発明において使用する上記式（I）で表されるアミノ酸配列をコードする遺伝子（以下、本発明の遺伝子という）は、特定の標的遺伝子に結合する転写因子のDNA結合ドメインをコードする遺伝子と融合させることにより、特定の遺伝子のみを標的にした転写抑制を行うことができる。

【0011】

すなわち、本発明の上記キメラ遺伝子は、これに対応する転写因子と上記式（I）の遺伝子産物であるペプチドが融合したキメラタンパク質を生成させ、該タンパク質における転写因子由来のDNA結合ドメインが結合する遺伝子の転写を特異的に抑制する。したがって、ある特定の遺伝子の転写抑制を行う場合、該遺伝子の転写を支配している転写因子を選び、該転写因子をコードする遺伝子の末端あるいはDNA結合ドメインに本発明の遺伝子を連結せしめてキメラ遺伝子を構築し、該遺伝子を適当なベクターに連結して、上記特定の遺伝子の転写を抑制したい生体部位に導入して、上記特定の遺伝子の転写を抑制すればいい。

【0012】

上記したように、本発明の上記キメラ遺伝子は、該遺伝子に対応するキメラタンパク質を生成させ、このキメラタンパク質が標的遺伝子と結合することにより、該標的遺伝子の転写を抑制するものであるから、このキメラタンパク質を別途合成し、これを直接標的遺伝子が存在する生体部位に導入してもよいことは当然である。

【 0 0 1 3 】

このキメラタンパク質の合成には、通常の遺伝子工学的手法を用いて行えばよく、例えば、上記キメラ遺伝子を適当なベクターに組み込み、これを用いて形質転換させた微生物を培養することにより、上記キメラタンパク質を多量に合成することができる。

【 0 0 1 4 】

本発明においては、上記式 (I) 中、Xについてはアミノ酸残基の数が0であっても転写抑制機能を有することは実験により確かめられており、また、アミノ酸残基の数には制限されないが、使用するペプチドまたは遺伝子の合成のし易さからみれば、短い方がよく、アミノ酸残基の数でいえば10以下、あるいは5以下になるように設計すればよい。

本発明の遺伝子の転写因子に対する結合位置は、該転写因子中のDNA結合ドメインをコードする領域の下流側であるが、この場合、該遺伝子を転写因子をコードする遺伝子に挿入しようとする場合、転写因子をコードする遺伝子の切断、本発明の遺伝子の連結、再結合等の面倒な操作を伴うので、単に該転写因子のタンパク質コード領域の下流側末端に、本発明の遺伝子を単に結合するのが簡便である。この点は本発明の利点の一つでもある。

【 0 0 1 5 】

また、Zのアミノ酸残基の数は重要であるが、驚くべきことに最低5個あれば転写抑制効果を示すことが見いだされた。さらに、これらXおよびZにおいてはアミノ酸の種類はどのようなものであってもよく、例えば、Zについては、上記従来技術に示した転写抑制ペプチドの共通モチーフ (L/F) D L N (L/F) (X) PのうちP (プロリン) は必要なく、単にアラニンを並べたものであっても極めて顕著な転写抑制効果を示した。

【 0 0 1 6 】

これに対して、LDLNL、あるいはLDLNのみの配列では転写抑制効果を示さず、また、Zについては5個あるいは6個のアミノ酸残基を有するよう設計したものは、極めて顕著な転写抑制効果を示すのに対して3個のアミノ酸残基を有するよう設計したものは全く抑制効果を示さない。すなわち上記式I中のZは、最低5個のアミノ酸残基からなるものでなければならない。もちろん、7個以上あるいは8個以上のものであっても転写抑制機能を示す。

【 0 0 1 7 】

以上のことから、転写因子を転写抑制因子に機能変換するための必要最小限のペプチドのアミノ酸配列は、Leu-Asp-Leu-Asn/Glu-Leu-Z（但し、Zは任意の5個のアミノ酸残基を表す。）であり、また、本発明において使用する必要最小限の遺伝子は、このペプチドをコードする遺伝子である。なお、本発明の遺伝子は、式（I）のアミノ酸配列をコードするものであれば塩基配列はどのようなものであってもよい。すなわち、本発明における転写活性化因子の転写抑制因子への機能変換は、上記式（I）のアミノ酸配列部分を含むキメラタンパク質により行われものであるから、上記式（I）のアミノ酸配列をコードし、該アミノ酸配列部分を生成するための遺伝子であればその塩基配列は問題ではないことは容易に理解されることである。また、本発明の遺伝子は、転写因子をコードする遺伝子と連結するための連結部位を設けてもよく、また本発明の遺伝子のアミノ酸読み枠と転写因子をコードする遺伝子読み枠が一致しない場合には、一致するように遺伝子を設計する。したがってそのための付加的な塩基配列を有していてもよい。

【 0 0 1 8 】

本発明において遺伝子の転写を抑制するには、上記キメラタンパク質を、直接生体に導入してもよいが、例えば植物の品種改良等を行う場合、恒常的に特定遺伝子の転写を抑制し、該遺伝子の発現を抑制する必要がある、上記キメラタンパク質をコードする遺伝子を適当なベクターに連結させ、この組換えベクターを用いて植物等を形質転換するのがより効果的である。これにより、キメラ蛋白質をコードする遺伝子は植物体内で恒常的に発現し、生成されたキメラ蛋白質は、

遺伝子の転写

を抑制し続ける。

【0019】

さらに、この転写抑制について、転写因子としてシロイヌナズナETHLEN-INSENSITIVE3遺伝子（以下、EIN3遺伝子という。）を用いた場合を例にとり、具体的に説明する。なお、このEIN3遺伝子及びその産生タンパクの配列を配列番号52に示す。

EIN3遺伝子産物であるEIN3タンパク質因子は、転写因子として機能し、植物ホルモンであるエチレンによって誘導される生理作用である黄化芽生えの形態変化（トリプルレスポンス）、伸長阻害、エチレン応答性遺伝子の発現などを媒体するエチレンシグナル伝達因子である。

【0020】

このEIN3遺伝子のDNA結合ドメインをコードする領域に、本発明の上記Iのアミノ酸配列をコードする遺伝子断片を連結してキメラ遺伝子とし、これを、例えば、カリフラワモザイクウイルス35Sプロモータを有する植物形質転換用ベクターに連結し、この組み換えベクターを用いてシロイヌナズナを形質転換する。これにより、シロイヌナズナ野生株が、エチレンあるいはその前駆体である1-アミノシクロプロパン-D-カルボン酸の存在下、黄化芽生えの形態変化（トリプルレスポンス）、伸長阻害を示すのに対して、上記形質転換されたシロイヌナズナは、これらのエチレン応答性の生理作用が著しく抑制され、発現されたEIN3タンパク質は転写抑制因子として、シロイヌナズナが有しているEIN3の転写活性化機能を逆に抑制機能に変換する。

【0021】

本発明において、転写抑制因子に変換される転写因子及びその遺伝子は、上記EIN3とその遺伝子、酵母GAL4、ERF4、CBF1、ERF2、ERF4、EREB1等のタンパク質またはその遺伝子等が挙げられるが、本発明は特にこれらに限定されるものではなく、広く動植物、微生物の転写因子及びその遺伝子が利用可能である。

【0022】

以下、本発明の実施例を示すが、本発明は特にこれら実施例に限定されるものではない。

以下の実施例においては、種々の合成した遺伝子断片について、酵母の GAL 4 転写因子の DNA 結合ドメインをコードしている領域と連結し、さらに植物細胞で機能するカリフラワーモザイクウイルス 35 S プロモータの下流につないで、エフェクタープラスミドを構築するとともに、カリフラワーモザイクウイルス 35 S プロモータのエンハンサー領域と GAL 4 タンパク質結合 DNA 配列とさらにカリフラワーモザイクウイルス 35 S プロモータの TATA 領域をプロモータ領域に結合した、ルシフェラーゼ遺伝子からなるリポーター遺伝子を構築し、これらエフェクターとリポーター遺伝子を同時に、シロイヌナズナ葉にパーティクルガンを用いて導入し、リポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子の活性を測定することによって調べたものである。なお、この測定法により転写抑制能を有していたものは、参考例 1 及び 2 において示されるように実際の植物体においても転写抑制能を有す

【 0 0 2 3 】

【実施例】

リプレッションドメインとして機能するペプチドの同定

(エフェクタープラスミド pGAL4DB-RD の構築 : 図 1)

クローンテック社製 (Clontech 社, USA) のプラスミド pBI221 を制限酵素 XhoI と SacI で切断し、T4 ポリメラーゼで平滑末端処理した後、アガロースゲル電気泳動で GUS 遺伝子を除き、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (以下 CaMV 35S) とノパリン合成酵素遺伝子の転写終止領域 (Nos ターミネーター、以下 Nos-ter) を含む 35S-Nos プラスミド断片 DNA を得た。

【 0 0 2 4 】

クローンテック社製の pAS2-1 ベクターを制限酵素 HindIII で消化し、酵母 GAL4 タンパク質の DNA 結合領域 (1-147 アミノ酸残基) をコードする 748 bp の DNA 断片 (以下 GAL4DBD) をアガロースゲル電気泳動によって単離した後、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をした。この GAL4DBD コード領域を含む DNA 断片を、先ほどの 35S-Nos の DNA の 35S プロモーターと Nos ターミネーター間の平滑末端

にした部位に挿入し、35Sプロモーターに対して酵母 GAL4 タンパク質のDNA結合領域の ORF が順方向に並んでいるものを選抜してp35S-GAL4DBD ベクターを構築した。

【 0 0 2 5 】

GAL4DBDのアミノ酸読み枠と読み枠が（フレーム）が一致するように設計した調査するペプチドをコードする両鎖のDNAを合成した。以下に合成した配列と、それらがコードしているアミノ酸配列を示す。

ERF3RD(214/225)

Amino acid sequence: DLDLNLAPPMEF (配列表における配列番号 1)

5' -CGATCTTGATCTTAACCTTGCTCCACCTATGGAATTTGAG-3' (配列番号 2)

5' -TCGACTCAAAATTCCATAGGTGGAGCAAGGTTAAGATCAAGG-3' (配列番号 3)

3 RD1

Amino acid sequence: LDLNLAPPMEF (配列番号 4)

5' -CCTTGATCTTAACCTTGCTCCACCTATGGAATTTGAG-3' (配列番号 5)

5' -TCGACTCAAAATTCCATAGGTGGAGCAAGGTTAAGATCAAGG-3' (配列番号 6)

3 RD2

Amino acid sequence: LDLNLAAAAAA (配列番号 7)

5' -CCTTGATCTTAACCTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAG-3' (配列番号 8)

5' -TCGACTCAAGCAGCAGCAGCAGCAGCAAGGTTAAGATCAAGG-3' (配列番号 9)

Min-LDLN

Amino acid sequence: LDLN (配列番号 10)

5' -CCTGGATCTAAATTAAG-3' (配列番号 11)

5' -TCGACTTAATTTAGATCCAGG-3' (配列番号 12)

Min-LDLNL

Amino acid sequence: LDLNL (配列番号 1 3)

5' -CCTGGATCTAAATCTGTAAG-3' (配列番号 1 4)

5' -TCGACTTACAGATTTAGATCCAGG-3' (配列番号 1 5)

SRD1

Amino acid sequence: LDLELRLGFA (配列番号 1 6)

5' -CCTGGATCTAGAACTCCGTTTGGGTTTCGCTTAAG-3' (配列番号 1 7)

5' -TCGACTTAAGCGAAACCCAAACGGAGTTCTAGATCCAGG-3' (配列番号 1 8)

SRD2

Amino acid sequence: LDLELGFA (配列番号 1 9)

5' -CCTGGATCTAGAACTCCGTTTCGCTTAAG-3' (配列番号 2 0)

5' -TCGACATTAGCGAAACCGAGTTCTAGATCCAGG-3' (配列番号 2 1)

LELDL

Amino acid sequence: LEIDLAAAAA (配列番号 2 2)

5' -ACTGGAACTAGATCTAGCTGCAGCTGCAGCTGCTTAA G-3' (配列番号 2 3)

5' -TCGACTTAAGCAGCTGCAGCTGCAGCTAGATCTAGTTCCAGT-3' (配列番号 2 4)

これらのペプチドをコードするDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、各pGALDBにつないだエフェクタープラスミドを構築した。

【 0 0 2 6 】

(レポーター遺伝子の構築：図 2 及び図 3)

35S-GAL4-LUCリポーター遺伝子の構築。

プラスミドpUC18 を制限酵素EcoRIとSstI で消化する。pBI221 プラスミド (クローンテック社) を 制限酵素EcoRIと SstIで消化し、Nos-ter (nopaline synthase terminator) 領域を含む270bpのDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって単離する。得られた断片を制限酵素EcoRIとSstI で消化しておいたプラスミド

pUC18 のEcoRI-SstI部位に挿入する。カリフラワーモザイクウイルス35SプロモーターTATAボックスを含む相補鎖のDNA 1（配列番号25）

AGCTTAGATCTGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTGGAGAGGACACGCTG及び

DNA 2（配列番号26）

GATCCAGCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCAGATCTAを合成する。

【0027】

合成したDNAを90℃ 2分加熱した後、60℃で1時間加熱し、その後室温（25℃）で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成させる。Nos-terを持つpUC18プラスミドを制限酵素 HindIIIと BamHI で消化する。合成した2本鎖DNAをpUC18のHindIII-BamHI部位に挿入し、TATA-boxとNos-terを含むプラスミドを構築する。上記の手順は、図2に示した。

【0028】

このプラスミドを制限酵素SstIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなう。

ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子(LUC)をもつプラスミドベクター PGV-CS2（東洋インキ社製）を制限酵素XbaIとNcoIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなった後、アガロースゲル電気泳動によって、ルシフェラーゼ遺伝子を含む1.65 kbのDNA断片を単離精製した。このDNA断片を上記のTATAボックスとNosターミネーターを含むプラスミドに挿入しTATA-LUC リポーター遺伝子を構築した。

【0029】

酵母の GAL4 タンパク質のDNA結合配列を5コピー持つプラスミド pG5CAT（Clontech社製）を制限酵素SmaIとXbaIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなった後、5コピーの GAL4 タンパク質のDNA結合配列含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。TATA-LUC ベクターを制限酵素 BglIIIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなう。この部位に平滑末端化した5コピーの GAL4 タンパク質のDNA結合配列含むDNA断片を挿入し、得られたプラスミドのうち GAL4 タンパク質のDNA結合配列が順方向に

向いているものを選抜し、リポーター遺伝子GAL4-LUC を構築した。(図3 参照)

【0030】

35S-GAL4-LUCの構築

プラスミドpBI121を鋳型として、5末アッパープライマー
CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC (配列番号27) と
3末ローワープライマー
AAGGGTAAGCTTAAGGATAGTGGGATTGTGCGTCATC (配列番号28) を用いてPCRをおこな
い、CaMV 35Sプロモーター-800~-46領域を含むDNA断片を得た。制限酵素Hind
IIIで消化した後、CaMV 35Sプロモーター-800~-46領域含む760bpのDNA断片を
アガロースゲル電気泳動によって単離する。このHindIII断片を、あらかじめ制
限酵素HindIIIで消化しておいたリポーター遺伝子GAL4-LUCに挿入し、CaMV 35S
プロモーター-DANが順方向に向いているものを選抜し、35S-GAL4-LUCリポーター
遺伝子を構築した。

【0031】

(レファレンス遺伝子の構築)

ウミシイタケ由来のルシフェラーゼ遺伝子をもつプロメガ社製カセットベクター
pRL-null を制限酵素NheIと XbaI 制限酵素で切断し、T4 DNA ポリメラーゼで
平滑末端化処理を行った後、アガロースゲル電気泳動で ウミシイタケ・ルシフ
ェラーゼ遺伝子を含む 948 bp の DNA 断片を精製する。この DNA 断片をエフェ
クタープラスミドの構築の際に用いたGUS遺伝子を除いたpBI221ベクターのGUS遺
伝子があった領域に挿入する。得られたプラスミドのうち、ウミシイタケ・ルシ
フェラーゼ遺伝子が順方向に向いているものを選抜する (pPTRL の構築)。

【0032】

(リポーター遺伝子の活性測定法)

シロイヌナズナ植物にリポーター遺伝子とエフェクタープラスミドをパーティ
クルガン法を用いて導入し、エフェクターの効果のリポーター遺伝子の活性を測
定することによって調べた。

【0033】

(パーティクルガンによる遺伝子導入)

pGAL4-LUCレポーター遺伝子1.6mgとエフェクタープラスミドとしてpGALDBと結合したペプチドのDNA排列を含むエフェクタープラスミドのDNAを各1.2mgと、リファレンス遺伝子プラスミド0.32mgを直径1mmの金粒(BioRad社製)510mgにコーティングした。生育期間21日目のシロイヌナズナ葉7枚を、水でしめらせた濾紙をおいた9cmシャーレにならべ、Bio-Rad社製PDS-1000/Heボンパートメント機をもちいてDNAを打ち込んだ。22℃で6時間明所で静置した後、レポーター遺伝子の活性を測定した。

【0034】

(ルシフェラーゼ活性測定)

6時間静置したシロイヌナズナ葉を、液体窒素中で粉砕し、Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega 社製) に添付されている Passive Lysis Buffer 200 uL に懸濁した後、遠心して上清を回収する。この細胞抽出液を 20mL をDual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega 社製) に添付されている測定バッファー100mlに混合し、ルミノメーター (TD20/20, Turner Design社製) を用いてルシフェラーゼ活性測定を行なった。ホタル・ルシフェラーゼおよびウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性の測定を測定キットの説明書に従って 10 秒間の発光を積分モードでカウントした。リファレンス遺伝子の活性値をリポーター遺伝子の活性値で割り、その相対値であるRelative luciferase activityを測定値として求めた。実験は、エフェクタープラスミドの種類ごと3回個別にトランジェントアッセイ実験をおこない、平均値と標準偏差を求めた。エフェクターを入れない場合のp35S-GAL4-LUCレポーター遺伝子の活性の相対値を100として、エフェクタープラスミドを同時に細胞に導入したときにリポーター遺伝子の活性値の変動によってエフェクターの効果を調査した。すなわち、p35S-GAL4-LUCレポーター遺伝子と各ペプチド配列のDNAを組み込んだpGALDBエフェクタープラスミドを導入したとき、リポーターの活性値が減少すれば、そのペプチドは、レポーター遺伝子の活性を抑制する効果(リプレッサー機能)があることを示している。以下、リポーターの活性値を測定して、p35S-GAL4-LUCリポーターの相対活性値が100以下になる場合に、導入したエフェクターにはリプレッサー機能

が存在するので、どのエフェクターがリプレッサーとして機能するのかをレポーターの活性を測定することによって調べた。

【0035】

(リプレッサードメインの同定)

上記に示した、ペプチド配列のうち、転写抑制効果をもつペプチドを解析するため、リポーター遺伝子p35S-GAL4-LUCとGAL4 DNA結合ドメインと結合したペプチドのエフェクタープラスミドをパーティクルガンを用いてシロイヌナズナ葉に導入し、リポーター遺伝子の活性を調べた。その結果を以下と図4に示す。

【0036】

ペプチド名 ペプチド配列 相対値(%)

ERF3RD(214/225) .DLNLNLAPPMEF 15.0

3RD1 LDNLNLAPPMEF 14.6

3RD2 LDNLNLAAAAAA 17.5

SRD1 LDLELRLGFA 2.0

SRD2 LDLELGFA 221

LELDL LELDLAAAAAA 196

Min-LDLN LDLN 153

Min-LDLNL LDLNL 150

【0037】

以上の結果から、ERF3RD(214/225), 3RD1, 3RD2, SRD1のペプチド配列が、リポーター遺伝子の活性をエフェクターを導入しないリポーター遺伝子のみの場合(コントロール)に比べ85%~98%減少させることから、LDLNLあるいは、LDLELを含み、C-末端側に任意の5アミノ酸を持つペプチドが、転写抑制能を持つ機能ペプチドとして作用することを証明した。対照実験としておこなったペプチド配列を含まないp35S-GALDBDは、リポーター遺伝子の活性を低下さなかった。このことは、GAL4DNA結合ドメインに結合したペプチドが、転写を抑制するリプレッサーとして機能していることを示している。

【0038】

【参考例1】

1) SUP遺伝子含有エフェクタープラスミドによる転写抑制

(1) SUP遺伝子の単離

SUP遺伝子の塩基配列は、すでに報告されている。シロイヌナズナSUP遺伝子のタンパク質コード領域の5'側と3'側に相当する配列をもつオリゴヌクレオチドをそれぞれ合成し、これらをプライマーとして、SUP遺伝子を含むTACライブラリーK14B15クローン（かずさDNA研究所より譲渡）を鋳型として、PCRを行い、SUP遺伝子のコード領域を含むDNA断片を単離した。全塩基配列を決定し、すでに報告されているSUP遺伝子のコード領域であることを確認した。なお上記PCR反応の条件は、変性反応94℃ 1分、アニール反応47℃ 2分、伸長反応74℃ 1分を1サイクルとして25サイクルおこなった。

(2) エフェクタープラスミドの構築 (SUP遺伝子の全タンパク質コード領域を含むエフェクタープラスミドpGAL4DB-SUPの構築：図5)

クローンテック社製(Clontech社, USA)のプラスミドpBI221を制限酵素XhoIとSacIで切断し、T4ポリメラーゼで平滑末端処理した後、アガロースゲル電気泳動でGUS遺伝子を除き、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター（以下CaMV 35S）とノパリン合成酵素遺伝子の転写終止領域（Nosターミネーター、以下Nos-ter）を含む35S-Nosプラスミド断片DNAを得た。

【0039】

クローンテック社製のpAS2-1ベクターを制限酵素HindIIIで消化し、酵母における転写活性化因子である GAL4 タンパク質のDNA 結合領域（1-147 アミノ酸残基）をコードする 748 bp の DNA 断片（以下GAL4DBD）をアガロースゲル電気泳動によって単離した後、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をした。このGAL4DBDコード領域を含むDNA断片を、先ほどの35S-NosのDNAの35SプロモーターとNosターミネーター間の平滑末端にした部位に挿入し、35Sプロモーターに対して酵母 GAL4 タンパク質のDNA 結合領域の ORF が順方向に並んでいるものを選抜してp35S-GAL4DBD ベクターを構築した。

【0040】

GAL4DBDの読み枠（フレーム）が一致するように設計したSUP遺伝子の5末アッププライマー primer 1（配列番号29：SUP遺伝子塩基配列1-18に結合）；G

ATGGAGAGATCAAACAGCと、

制限酵素SalI部位を持つ3末ローワープライマー primer 2（配列番号30：SUP遺伝子塩基配列602-641に結合）；

GA

TAAAGTTATTACCGTCGACTTAAGCGAAAC

を用いてSUP全タンパク質コード領域（配列番号31：SUPタンパク質コード領域塩基配列；アミノ酸配列1-204）をPCR法によって増幅し、DNA断片を得た。PCR反応の条件は、変性反応94℃ 1分、アニール反応℃47℃ 2分、伸長反応74℃ 1分を1サイクルとして25サイクルおこなった。以下全てのPCR反応は同じ条件でおこなった。得たDNA断片を制限酵素SalIで消化した後、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このSUPをコードするDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-SUPを構築した。

【0041】

（3）SUPアミノ酸175-204を含むエフェクタープラスミドpGAL-175/204SUPの構築

GAL4DBDをコードするフレームと読み枠が一致するように設計した5末アッププライマー primer 3（配列番号32：結合部位SUP塩基配列522-539）；

GAATGATGAAATCATCAGと、

制限酵素SalI部位を持つ3末ローワープライマー primer 2（配列番号29：結合部位SUP塩基配列602-641）；

GATAAAGTTATTACCGTCGACTTAAGCGAAAC

を用いてSUPのアミノ酸配列 175/204コード領域に該当する塩基配列522-641の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素SalIで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離し、塩基配列を決定した。このSUPのアミノ酸配列175/204をコードするDNA断片（DNA領域522-615）を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGALDB-175/204SUPを構築した。

【0042】

（4）比較対照エフェクタープラスミドの構築（図6）

シロイヌナズナAtERF5cDNAを含むクローンpAtERF5を鋳型として、
5末アッププライマー primer 4 (配列番号 3 3) ;

CATGGCGACTCCTAACGAAGTATCTGCACと

3末ロープライマー primer 5(配列番号 3 4) ;

ATCGTTCAAAAACTCAAGGCTAACTAATCAACAACGGTC

を用いてAtERF5全タンパク質コード領域をPCR法によって増幅した。このDNA断片を、上記に示した平滑末端にした35S-Nosプラスミド断片に組み込み、エフェクタープラスミドp35S-AtERF5を構築した。

また、これとは別に、SUP遺伝子及び175/204SUPを用いない他は上記手段と同様にしてエフェクタープラスミドpGAL4DBを構築した。

【 0 0 4 3 】

2. レポーター遺伝子の構築

リポーター遺伝子として、以下の手法により、35S-GAL4-LUCおよびGAL4-GCC-LUCの2種を構築した。

(1) 35S-GAL4-LUCの構築 (図 7 及び図 8)

a. GAL4-LUCの構築

プラスミドpUC18 を制限酵素EcoRIとSstI で消化した。一方、pBI221 プラスミド (クローンテック社) を 制限酵素EcoRIと SstIで消化し、Nos-ter (nopaline synthase terminator) 領域を含む270bpのDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって単離した。得られた断片を制限酵素EcoRIとSstI で消化しておいたプラスミドpUC18 のEcoRI-SstI部位に挿入した。次いで、カリフラワーモザイクウイルス35SプロモーターTATAボックスを含む相補鎖のDNA 1 (配列番号 3 5)

AGCTTAGATCTGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTGと

DNA 2 (配列番号 3 6)

GATCCAGCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCAGATCTA

を合成した。合成したDNAを90℃ 2分加熱した後、60℃で1時間加熱し、その後室温(25℃)で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成させた。Nosを持つpUC18プラスミドを制限酵素HindIIIとBamHIで消化する。合成した2本

鎖DNAをpUC18のHindIII-BamHI部位に挿入し、TATA-boxとNos-terを含むプラスミドを構築した。上記の手順は、図7に示した。

【0044】

このプラスミドを制限酵素SstIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理した。

一方、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子(LUC)をもつプラスミドベクター PGV-CS 2 (東洋インキ社製) を 制限酵素XbaI とNcoIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなった後、アガロースゲル電気泳動によって、ルシフェラーゼ遺伝子を含む 1.65 kb の DNA 断片を単離精製した。このDNA断片を上記のTATAボックスとNosターミネーターを含むプラスミドに挿入しTATA-LUC リポーター遺伝子を構築した。

さらに、酵母の GAL4 タンパク質のDNA結合配列を5コピー持つプラスミド pG5CAT (Clontech社製) を 制限酵素SmaIと XbaIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなった後、5コピーの GAL4 タンパク質のDNA結合配列含む DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。TATA-LUC ベクターを制限酵素BglIIIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をおこす。この部位に平滑末端化した5コピーの GAL4 タンパク質のDNA結合配列含む DNA 断片を挿入し、得られたプラスミドのうち GAL4 タンパク質のDNA結合配列が順方向に

向いているものを選抜し、リポーター遺伝子GAL4-LUC を構築した。

【0045】

b. 35S-GAL4-LUCの構築 (図8)

プラスミドpBI121を鋳型として、

5末アップライマー primer 6 (配列番号37) ;

CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACと

3末ロープライマー primer 7 (配列番号38) ;

AAGGGTAAGCTTAAGGATAGTGGGATTGTGCGTCATC

を用いてPCRをおこない、CaMV 35Sプロモーター-800~-46領域を含むDNA断片を得た。制限酵素HindIIIで消化した後、CaMV 35Sプロモーター-800~-46領域含む

760bpのDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって単離する。このHindIII断片を、あらかじめ制限酵素HindIIIで消化しておいたリポーター遺伝子GAL4-LUCに挿入し、CaMV 35Sプロモーター-DANが順方向に向いているものを選抜し、35S-GAL4-LUCリポーター遺伝子を構築した。

【0046】

(2) GAL4-GCC-LUCの構築 (図9及び図10)

4個のGCC box配列 (AGCCGCC) を含む45bpDNAの相補鎖 (下記) を合成し、70℃で15分間加熱した後、室温で60分放置し、アニールさせ、2本鎖DNAとした。

5' -GATCAGCCGCCGATCAGCCGCCGATCAGCCGCCGATCAGCCGCC-3' (配列番号39)

3' -TCGGCCGGCTAGTCGGCCGGCTAGTCGGCCGGCTAGTCGGCCGGGATC-5' (配列番号40)

この45bpのDNA断片を、制限酵素BglIIIで予め消化しておいた上記のTATA-LUCベクターと1:1のモル数になるように混合し、T4リガーゼを用いてライゲーションをおこない、GCC bpxを含むDNA断片が順方向に入っているものを選択し、プラスミドGCC-LUCを構築した。

このプラスミドを制限酵素BglIIIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなう。

【0047】

一方、酵母の GAL4 タンパク質のDNA結合配列を5コピー持つプラスミド pG5CAT (Clontech社製) を 制限酵素SmaIと XbaIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなった後、5コピーの GAL4タンパク質のDNA結合配列を含む DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。このDNA断片を、平滑末端処理をした、GCC-LUCプラスミドに挿入し、GAL4配列が順方向に入っているものを選択し、GAL4-GCC-LUCリポーター遺伝子を構築した。

【0048】

(3) パーティクルガンによる遺伝子導入

pGAL4-LUCレポーター遺伝子1.6 μ g、エフェクタープラスミド として pGALDB-SUP、あるいはそのデレーションであるpGALDB-175/204SUPのDNA1.2 μ g、比較対照プラスミドp35S-AtERF5あるいはpGAL4DB1.2 μ g、及び リファレンス遺伝子プラスミド0.32 μ gを直径1mmの金粒(BioRad社製)510 μ gにコーティング

した。生育期間 21 日目のシロイヌナズナ葉 7 枚を、水でしめらせた濾紙をおいた 9 cm シャーレにならべ、Bio-Rad 社製 PDS-1000/He ボンバートメント機をもちいて DNA を打ち込んだ。次いで、22℃で 6 時間明所で静置した後、レポーター遺伝子の活性を測定した。

【0049】

(4) ルシフェラーゼ活性測定

6 時間静置したシロイヌナズナ葉を、液体窒素中で粉砕し、Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega 社製) に添付されている Passive Lysis Buffer 200 μ L に懸濁した後、遠心して上清を回収する。この細胞抽出液を 20 μ L を Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega 社製) に添付されている測定バッファー 100 μ L に混合し、ルミノメーター (TD20/20, Turner Design 社製) を用いてルシフェラーゼ活性測定を行なった。ホタル・ルシフェラーゼおよびウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性の測定を測定キットの説明書に従って 10 秒間の発光を積分モードでカウントした。リファレンス遺伝子の活性値をリポーター遺伝子の活性値で割り、その相対値である Relative luciferase activity を測定値として求めた。実験は、エフェクタープラスミドの種類ごと 3 回個別にトランジェントアッセイ実験をおこない、平均値と標準偏差を求めた。エフェクターを入れない場合の p35S-GAL4-LUC レポーター遺伝子の活性の相対値を 100、pGAL4-GCC-LUC リポーター遺伝子の相対値を 1 として、エフェクタープラスミドを同時に細胞に導入したときにリポーター遺伝子の活性値の変動によってエフェクターの効果を調査した。

【0050】

その結果を図 9 および 11 に示す。

なお、図 9 および 11 において A はリポーター遺伝子とエフェクタープラスミドを示す図である。これら図において、5XGAL4 は GAL4 転写因子 DNA 結合配列、TATA は CaMV35S プロモーター TATA ボックスを含む領域、LUC はルシフェラーゼ遺伝子、CaMV35S はカリフラワーモザイクウイルス 35S タンパク質遺伝子プロモーター、GAL4DB は酵母 GAL4 転写因子 DNA 結合ドメインコード領域、Nos はノパリン合成酵素遺伝子転写終止領域をそれぞれ表す。

【0051】

BはSUPおよびSUPのディリーションがリポーター遺伝子の活性(Relative Activity)に及ぼす影響を示す図である。図において、左の数字(175/204等)は、SUPのアミノ酸領域を示す。真ん中のボックスは左の数字に該当するアミノ酸配列領域を示す。右のグラフは、左の領域をもつエフェクタープラスミドを導入したときのリポーター遺伝子の活性を示す。

【0052】

図11の結果によれば、p35S-GAL4-LUCレポーター遺伝子とpGALDB-SUPエフェクタープラスミドを導入したときのリポーターの活性値が減少することから、pGALDB-SUPは、レポーター遺伝子の活性を抑制する効果(リプレッサー機能)があることを示している。pGALDB-SUPエフェクターは、リポーター遺伝子の活性をエフェクターを導入しないリポーター遺伝子の場合(コントロール)に比べ75%減少させた。対照実験としておこなったSUPのコード領域を含まないp35S-GALDBDは、リポーター遺伝子の活性を低下さなかった。このことは、SUPが転写を抑制するリプレッサーとして機能していることを示している。

【0053】

また、SUP遺伝子のタンパク質コード領域をディリーションしたDAN断片をもつエフェクタープラスミドであるpGALDB-175/204SUPは、pGALDB-SUPを導入した場合よりもさらなる抑制効果を示し、レポーター遺伝子の活性を95%抑えるリプレッサー機能があることが示された。(図11; 175/204SUP)。

この結果から、SUPのリプレッサー機能を持つ領域(リプレッションドメイン)は、SUPのアミノ酸配列、175/204領域に存在することを明らかとなった。

【0054】

また、図12の結果によれば、GAL4-GCC-LUCリポーター遺伝子と、転写活性化能を持つことが示されているp35S-ATERF5エフェクタープラスミドをシロイヌナズナ葉にパーティクルガンで導入しすると、リポーター遺伝子の活性は、エフェクタープラスミドを導入しない場合(1とする)に比べ、15倍以上上昇した。リポーター遺伝子とp35S-AtERF5さらにpGAL4DB-SUPを同時に導入した場合、リポーター遺伝子の活性は、2.5倍程度にしか上昇しなかった。よって、このこと

は、SUPタンパク質は、AtERF5の転写活性化能を84%(1-2.5/15)抑制する効果を持つことを示している。さらに、SUPのディリーション領域を持つpGAL4DB-175/204 SUPをGAL4-GCC-LUCリポーター遺伝子とpATERF5エフェクターと同時に導入した場合、リポーター遺伝子の活性を90%抑制する効果を示した。p35S-AtERF5によるリポーター遺伝子の活性の上昇は、pGAL4DBを導入した場合には、影響されないことから、リポーター遺伝子の転写抑制効果は、SUPタンパク質の効果であることを示している。

【 0 0 5 5 】

2) SUPERMANリプレッションドメインをE I N 3カルボキシル基側に付加したプラスミドによる、植物体におけるE I N 3の転写活性化機能の抑制

(1) 形質転換用ベクターpBIG2の構築

クローンテック社製 (Clontech社, USA) のプラスミドp35S-GFPを制限酵素HindIIIとBamHIで切断し、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター (CaMV 35S) を含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離し回収した。

米国ミシガン州立大学より譲渡された植物形質転換用ベクターpBIG-HYG (参考文献 Becker, D. 1990 Nucleic Acid Research18:203) を制限酵素HindIIIとSst Iで切断し、アガロースゲル電気泳動によってGUS遺伝子を除いたDNA断片を得る。

【 0 0 5 6 】

以下の配列を有するDNAを合成し、70℃で10分加温した後、自然冷却によりアニールさせて2本鎖DNAとする。このDNA断片には、5'末端にBamHI制限酵素部位、翻訳効率を高めるタバコモザイクウイルス由来のomega配列、および制限酵素部位SmaI SalIを有する。

5'-GATCCACAATTACCAACAACAACAACAACAACATTACAATTACAGATCCCGGGGTACCGTCCGAGCTC-3' (配列番号41)

5'-CGTCGACGGTACCCCGGGATCTGTAATTGTAATGTTGTTTGTGTTTGTGTTGTTGYGGTAATTGTG-3' (配列番号42)

CaMV 35Sプロモーター領域をふくむDNA断片と合成した2本鎖DNAをGUS遺伝子

を除いたpBIG-HYGのHindIII、SstI部位に挿入し、植物形質転換用ベクターpBIG2を得た。

【0057】

(2) 形質転換ベクターpEIN3SUPRDの構築

米国ソーグ研究所から譲渡された、EIN3cDNAの全長を含むpEIN3クローンを鋳型として、

5末アッパープライマー primer 8 (配列番号43) ;

AATGATGTTTAATGAGATGGGと

3末ローワープライマー primer 9 (配列番号44) ;

ATGAATCCCCGGGATATTATTCを用いて、EIN3のアミノ酸配列1-162コード領域に該当する塩基配列1-485の領域を含むDNA断片をPCR法によって増幅し、制限酵素SmaIで切断した後、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。

この断片を制限酵素SmaIで切断したpBIG2に挿入し、順方向にクローニングされているものを単離し、pBIGII-EIN3-1/162を得た。

【0058】

EIN3cDNAの全長を含むpEIN3クローンを制限酵素SmaIとPstIで切断し、アガロース電気泳動によってEIN3のアミノ酸配列163-565の領域をコードするDNA断片(486-1694)を単離した。このDNA断片を、制限酵素SmaIとPstIで切断しておいたクローニングベクターpBluescriptIIに挿入しプラスミドpEIN3-163-565を作成した。

EIN3cDNAの全長を含むpEIN3クローンを鋳型として、

5末アッパープライマー primer 10 (配列番号45) ;

CGACACTGCAGATCACAACと

3末端の終止コドンTAAをCCCに変換した、3末ローワープライマー primer 11 (配列番号46) ;

ATCCCGAACCATATGGATACATCTTGCTGC

を用いてEIN3のアミノ酸配列566-628コード領域に該当する塩基配列1695-188の領域を含むDNA断片をPCR法によって増幅し、制限酵素PstIで切断した後、アガロース電気泳動によって単離した。

先に述べた参考例1、1) (3)と同様にアミノ酸の読み枠が一致するように作成しておいた、3'末端に制限酵素SalI部位を有するSUPERMANのアミノ酸配列175/204コード領域に該当する塩基配列522-641の領域を含むDNA断片と、EIN3のアミノ酸配列566-628コード領域に該当する塩基配列1695-1888の領域を含むDNA断片を、制限酵素PstI、SalIで切断しておいた上記pEIN3-163 /565EIN3に挿入し、pEIN3-163/628-SupRDを作成した。

【0059】

プラスミドpEIN3-163/628-SupRDを、制限酵素SmaIとSalIで切断し、EIN3のアミノ酸配列163-628領域とSUPERMANの175/204の領域をコードするDNA断片を、アガロース電気泳動によって単離した。単離した断片を、上記で述べたpBIG2-EIN3-1/162を制限酵素SmaIで切断したpBIG2-EIN3-1/162に挿入し、35S-EIN3-SupRD-Nosを含む形質転換ベクターpEIN3SUPRDを得た。

【0060】

(3) pEIN3SUPRDで形質転換した植物体の作成

pEIN3SUPRDによるシロイヌナズナ植物の形質転換は、Transformation of *Arabidopsis thaliana* by vacuum infiltration (<http://www.bch.msu.edu/pamgreen/protocol.htm>) に従った。ただし、感染させるのにバキュームは用いないで、浸すだけにした。プラスミドpEIN3RDを、土壌細菌 [(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (C58C1Rifr) pMP90 (Gmr) (koncz and Schell 1986)] 株にエレクトロポレーション法で導入した。

導入した菌を1リットルの下記のYEP培地でOD600が1になるまで培養した。

Y EP medium (1 liter)	
10 g	Bacto peptone
10 g	yeast extract
5g	NaCl

次いで、培養液から菌体を、回収し、1リットルの下記の感染用培地 (Infiltration medium) に懸濁した。

Infiltration medium (1 liter)	
2.29g	MS salt
50g	Sucrose
0.5g	MES
to pH 5.7 with KOH	
0.044	uM benzylaminopurine
0.2ml	Silwet L-77

【0061】

この溶液に、14日間生育したシロイヌナズナを1分間浸し、感染させた後、再び生育させ結種させる。回収した種子を50%ブリーチ、0.02%Triton X-100溶液で7分間滅菌した後、滅菌水で3回リンスし、滅菌した下記のハイグロマイシン選択培地に蒔種する。

ハイグロマイシン選択 培地	
4.3g/l	MSsalts
1%	sucrose
0.5g/l	MES
to pH 5.7 with KOH	
0.8%	phytagar
30g/ml	Hygromicine
500ml	vancomycin

ハイグロマイシンプレートで生育する軽質転換植物体を選抜し、土壤に植え換え、次世代の種子を得た。

【0062】

(4) 形質転換植物のエチレン感受性の有無

得られた次世代 (T2) の軽質転換植物の種子を、エチレンの前駆体である 1-aminocyclopropane-D-carboxylic acid (ACC) が最終濃度 10uM 添加され、滅菌さ

れた下記の生育培地を含む MSプレートに蒔種した。

MS プレート 生育 培地	
4.3g/l	MSsalts
1%	sucrose
0.5g/l	MES
topH5.7	with KOHII
0.8%	phtager
ACC. (final. 10uM)	

これを、4℃で3日間低温処理した後、暗所22℃で3日間生育させ、定法に従って、エチレン応答を示す生理現象である、黄化芽生えでのトリプルレスポンス（3重応答）を観察した。結果を図13及び14に示す。

【0063】

図13及び14によれば、野生株である Col-0は、ACCの存在下で、茎長フックが屈曲し、根の伸長が抑制されるトリプルレスポンスを示すが、pEIN3SUPRDで形質転換した植物体（図13；EIN3-SupRD）では、EIN3の変異体であるein3植物体（図13；ein3-1）と同様に、茎長の屈曲および根の伸長阻害がみられず、エチレン非応答性の形質を示した。また、常光下で生育させた野生型植物体は、エチレンガス（100ppm 1ml/min）常時存在下で、エチレン応答性の生理現象である矮性の植物体になるが、pEIN3SUPRDで形質転換した植物体（図14；SUPRD）では、EIN3の変異体であるein3植物体（図14；ein3）よりもやや大きな植物体となり、ein3植物体よりもエチレン非感受性が高いein2植物体（図14；ein2）をエチレン存在下で生育させた植物と同様な大きさを示した。

さらに、野生型でエチレンで誘導されるが、エチレン非応答性の変異体であるein3植物体では、誘導されない遺伝子であるPDF1.2遺伝子、塩基性キチナーゼ（BCHN）遺伝子およびEthylene Responsive Factor1（ERF1）遺伝子の発現について、野生型と pEIN3SUPRDで形質転換した植物体からRNAを精製し、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて

調べた。

【0064】

その結果、図15に示すように、エチレン処理（100ppMエチレンガス、12時間）した野生型では、PDF1.2、ERF1およびBCHN遺伝子の発現の誘導がみられた。

一方、pEIN3SUPRDで形質転換した植物体では、エチレン処理をおこなっても、ein3変異体植物同様PDF1.2、ERF1およびBCHN遺伝子の発現の誘導がみられず、エチレン非応答性の形質を示した。

以上の結果から、SUPERMAN の175-204 のアミノ酸配列を持つペプチドおよびそれをコードする遺伝子は、任意の転写因子を転写抑制因子に変換できる能力を有していることが明らかである。

【0065】

【参考例2】

ERF3リプレッションドメインをEIN3カルボキシル基側に付加したプラスミドによる、植物体におけるEIN3の転写活性化機能の抑制

（1）形質転換用ベクターpBIGIIの構築

クローンテック社製（Clontech社，USA）のプラスミドp35S-GFPを制限酵素HindIIIとBamHIで切断し、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター（CaMV35S）を含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離し回収した。

【0066】

一方、米国ミシガン州立大学より譲渡された植物形質転換用ベクターPBI-HYG（参考文献 Becker' D. 1990 NucleicAcid Research18:203）を制限酵素HindIIIとSstIで切断し、アガロースゲル電気泳動によってGUS遺伝子を除いたDNA断片を得た。

次いで、以下の配列を有するDNAを合成し、70℃で10分加温した後、自然冷却によりアニールさせて2本鎖DNAとした。このDNA断片には、5'末端にBamHI制限酵素部位、翻訳効率を高めるタバコモザイクウイルス由来のomega配列、および制限酵素部位SmaI、SalI、SstIを有する。

5'-GATCCACAATACCAACAACAACAACAACAACAACATTACAATTACAGATCCCGGGGTACCGTCGACGAGCTC-3'（配列番号41）

CaMV35Sプロモーター領域をふくむDNA断片と合成した2本鎖DNAをGUS遺伝子を除いたpBIG-HYGのHindIII、SstI部位に挿入し、植物形質転換用ベクターpBIG2を完成させた。

(2) 形質転換ベクターpEIN3RDの構築

5末アッパープライマー primer 8 (配列番号43) ;

3末ローワープライマー primer9 (配列番号44) ;

を用いてEIN3のアミノ酸配列1-162コード領域に該当する塩基配列1-485の領域を含むDNA断片をPCR法によって増幅し、制限酵素Sma Iで切断した後、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。この断片を、制限酵素Sma Iで切断したpBIG2に挿入し、順方向にクローニングされているものを単離し、pBIG2-EIN3-1/162を得た。

PCR反応の条件は、変性反応94℃1分、アニール反応℃47℃ 2分、伸長反応74℃1分を1サイクルとしてで25サイクルおこなった。以下全てのPCR反応は同じ条件でおこなった。

EIN3cDNAの全長を含むpEIN3クローンを鋳型として、

出証特 2 0 0 3 - 3 0 0 4 1 1 7

CGACACTGCAGATCACAACと、

3'末端の終止コドンTAAをCCCに変換した3'末ローワープライマー primer 11 (配列番号46) ;

ATCCCGAACCATATGGATACATCTTGCTGC

を用いてEIN3のアミノ酸配列566-628コード領域に該当する塩基配列1695-1888の領域を含むDNA断片をPCR法によって増幅し、制限酵素Pst Iで切断した後、アガロース電気泳動によって単離した。

【0069】

3'末端に制限酵素Sal I部位を有するERF3 (配列番号25) のアミノ酸配列191-225をコードする領域に相当する塩基配列569-678の領域のDNA断片を、EIN3のカルボキシル基末端とフレームと読み枠が一致するように設計した。なお、ERF3の全長遺伝子の塩基配列及びそのアミノ酸配列は配列番号53に示すとおりである。

5'末アッパープライマー primer 12 (配列番号47 ; 結合部位ERF3塩基配列569-593) ;

AGTGGGTCCTACTGTGTCGGACTCと

制限酵素Sal I部位を持つ3'末ローワープライマー primer 13 (配列番号48 ; 結合部位ERF3塩基配列661-678) ;

CCAAATAACATTATCGGT

CGACTCAAAATTCCATAGGTG

を用いてERF3のアミノ酸配列191/225コード領域に該当する塩基配列569-678の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素sal Iで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。

【0070】

このERF3のリプレッションドメインをコードするDNA断片と、EIN3のアミノ酸配列566-628をコードする塩基配列1695-1888のDNA断片を、制限酵素Pst I - Sal Iで切断しておいた上記pEIN3-163/565EIN3に挿入し、pEIN3-163/628-RDを作成した。

プラスミドpEIN3-163/628-RDを、制限酵素Sma I とSal Iで切断し、EIN3のアミノ酸配列163-628領域とERF3の191-225の領域をコードするDNA断片を、アガ

ロース電気泳動によって単離した。単離した断片を、上記で述べたpBIG2-EIN3-1/162を制限酵素SmaIで切断したpBIG2-EIN3-1/162に挿入し、35S-EIN3-RD-Nosを含む形質転換ベクターpEIN3RDを完成させた。

【0071】

(3) 比較対象形質転換ベクターの構築

上記と同じ方法で、下記配列のERF3の191-225のリプレッションドメインの215と217番目のアスパラギン酸を共にアラニンに置換した変異ドメインを持つRDmをコードするDNA断片を挿入しpEIN3RDmを完成させた。 VGPTVSDSSSSAVEENQYDGKR DIALALNLAPPEF (配列番号49)

アラニン置換した変異ドメインをコードするDNAは、以下の両ストランドを合成した。

5'-AGTGGGTCCTACTGTGTCGGACTCGTCCTCTGCAGTGGAAAGAGAACCAATATGATGGGGAAAAGAGGAA
TTGATCTTGATCTTAACCTTGCTCCACCTATGGAATTTTGAG-3' (配列番号50)

5'-TCGACTCAAAATTCCATAGGTGGAGCAAGGTTAAGATCAAGATCAATTCCTCTTTTCCCCATCATATT
GGTTCTCTTCCACTGCAGAGGACGAGTCCGACACAGTAGGACCCACT-3' (配列番号51)

(4) pEIN3RDで形質転換した植物体の作成

参考例1、2)(3)と全く同様にして、形質転換ベクターpEIN3PRDおよびpEIN3RDm比較対象形質転換ベクターを用いてシロイヌナズナ植物の形質転換を行い、さらにハイグロマイシンプレートで選抜し、次世代の種子を得た。

(5) 形質転換植物のエチレン感受性の有無

得られた次世代(T2)形質転換植物の種子を、参考例1、2)(4)と同様にして生育させ、エチレン応答を示す生理現象である、黄化芽生えでのトリプルレスポンス(3重応答)を観察した。同一条件下で野生株Col-0およびEIN3の変異体であるein3植物体のエチレン応答性も観察した。結果を図14、16に示す。

【0072】

図16によれば、野生株であるCol-0は、ACCの存在下で、茎長フックが屈曲し、根の伸長が抑制されるトリプルレスポンスを示す。また、ERF3の191-225の

リプレッションドメインの215と217番目のアスパラギン酸を共にアラニンに置換した変異ドメインを持つRDmを有するpEIN3-RDmで形質転換された植物体（図16；EIN3-RDm）も、上記野生株Col-0と同様のエチレン応答性を示す。これに対して、pEIN3RDで形質転換された植物体（図16；EIN3-RD）では、EIN3の変異体であるein3植物体（図16；ein3-1）と同様に、茎長の屈曲および根の伸長阻害がみられず、エチレン非応答性の形質を示した。

【0073】

また、図14によれば、常光下で生育させた野生型植物体は、エチレン（100ppm、12時間）常時存在下で、エチレン応答性の生理現象である矮性の植物体（図14；Wild）になるが、pEIN3RDで形質転換した植物体（図14；RD）では、EIN3の変異体であるein植物体（図14；ein3）とほとんど変わらない大きさを示した。

さらに、野生型でエチレンで誘導されるが、エチレン非応答性の変異体であるein3植物体では、誘導されない遺伝子であるPDF1.2遺伝子、塩基性キチナーゼ（BCHN）遺伝子およびEthylene Responsive Factor1(ERF-1)遺伝子の発現について、野生型とpEIN3RDで形質転換した植物体からRNAを精製し、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて調べた。

【0074】

その結果、図15に示すように、エチレン処理（100ppmエチレンガス、12時間）した野生型では、PDF1.2、ERF-1およびBCHN遺伝子の発現の誘導がみられる。一方、pEIN3RDで形質転換した植物体では、エチレン処理をおこなっても、ein3変異体植物同様PDF1.2、ERF1およびBCHN遺伝子の発現の誘導がみられず、エチレン非応答性の形質を示した。

以上の結果から、ERF3の191-205のアミノ酸配列を持つペプチドおよびそれをコードする遺伝子は、任意の転写活性化因子を転写抑制因子に変換できる能力を持つ。

【0075】

【発明の効果】

本発明の遺伝子の転写を抑制するために用いる遺伝子及びペプチドは遺伝子は

極めて短いサイズであるため、その合成は極めて簡単であり、しかも、しかも極めて効果的に遺伝子の転写を抑制するものである。また、本発明の転写抑制遺伝子を、特定の遺伝子に結合する転写活性化因子遺伝子のDNA結合ドメインと融合することにより、遺伝子特異的に転写を抑制することが可能となる。

したがって、本発明の遺伝子を、例えばガン遺伝子の転写調節領域に特異的に結合するDNAと融合させて、細胞内で発現させることにより、ガン遺伝子の発現を効率的に抑制することが可能となる他、例えば植物においては、色素代謝系の酵素をコードする遺伝子の発現を制御することが可能となり、これまでには得られなかった色違いの花弁を有する花を創作することもできる。また、アレルゲンとなるタンパク質の発現を抑制することによって、アレルゲンの少ない食物の生産も可能となる等の極めて有用な効果を奏するものである。

【0076】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> 転写抑制遺伝子及びペプチド

<130> 220-01329

<160> 53

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 1

Asp Lue Asp Leu Asn Leu Ala Pro Pro Met Glu Phe

1 5 10

<210> 2

<211> 41

<212> DNA

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 2

cgatcttgat cttaaccttg ctccacctat ggaattttga g

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 3

tcgactcaaa attccatagg tggagcaagg ttaagatcaa gatcg

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<400> 4

Lue Asp Leu Asn Lue Ala Pro Pro Met Glu Phe

1 5 10

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial

<400> 5

ccttgatctt aaccttgctc cacctatgga attttgag

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial

<400> 6

tcgactcaaa attccatagg tggagcaagg ttaagatcaa gg

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<400> 7

Leu Asp Lue Asn Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1

5

10

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial

<400> 8

ccttgatctt aaccttgctg ctgctgctgc tgcttgag

<210> 9

<211> 43

<212> DNA

<213> artificial

<400> 9

tcgactcaag cagcagcagc agcagcaagg ttaagatcaa gg

<210> 10

<211> 4

<212>PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

Leu Asp Leu Asn

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 11

cctggatcta aattaag

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

tcgacttaat ttagatccag g

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 13

Leu Asp Leu Asn Lue

<210> 14

<211>

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 14

cctggatcta aatctgtaag

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 15

tcgacttaca gatttagatc cagg

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 16

Lue Asp Leu Glu Lue Arg Lue Gly Phe Ala

1

5

10

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 17

cctggatcta gaactccggt tgggtttcgc ttaag

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 18

tcgacttaag cgaaacccaa acggagttct agatccagg

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 19

Lue Asp Leu Glu Lue Gly Phe Ala

1 5

<210> 20

<211> 39

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 20

cctggatcta gaactcgggt tcgcttaag

<210> 21

<211> 43

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 21

tcgacttaag cgaaaccgag ttctagatcc agg

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 22

Lue Glu Leu Asp Lue Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 38

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 23

actggaacta gatctagctg cagctgcagc tgcttaag

<210> 24

<211> 42

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 24

tcgacttaag cagctgcagc tgcagctaga tctagttcca gt

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 25

catggcgact cctaacgaag tatctgcac

<210> 26

<211> 39

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 26

atcggttcaaa aactcaaggc taactaatca acaacggtc

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 27

cgccagggtt ttcccagtcg cgac

<210> 28

<211> 37

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 28

aagggttaagc ttaaggatag tgggattgtg cgtcatc

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 29

gatggagaga tcaaacagc

<210> 30

<211> 32

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 30

gataaagtta ttaccgtcga cttagcgaa ac

<210> 31

<211> 615

<212> DNA

<213> Arabidopdis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1) (615)

<223>

<300>

<301> Sakai, H., Medrano, L.J. and Meyerowitz, E.M.

<302> Role of SUPERMAN in maintaining Arabidopsis floral whorl boundaries

<303> Nature

<304> 378

<305> 6553

<306> 199-203

<307> 1995

<308> U38946

<400> 31

atg gag aga tca aac agc ata gag ttg agg aac agc ttc tat ggc cgt 48
 Met Glu Arg Ser Asn Ser Ile Glu Leu Arg Asn Ser Phe Tyr Gly Arg
 1 5 10 15
 gca aga act tca cca tgg agc tat gga gat tat gat aat tgc caa cag 96
 Ala Arg Thr Ser Pro Trp Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Asn Cys Gln Gln
 20 25 30
 gat cat gat tat ctt cta ggg ttt tca tgg cca cca aga tcc tac act 144
 Asp His Asp Tyr Leu Leu Gly Phe Ser Trp Pro Pro Arg Ser Tyr Thr
 35 40 45
 tgc agc ttc tgc aaa agg gaa ttc aga tcg gct caa gca ctt ggt ggc 192
 Cys Ser Phe Cys Lys Arg Glu Phe Arg Ser Ala Gln Ala Leu Gly Gly
 50 55 60
 cac atg aat gtt cac aga aga gac aga gca aga ctc aga tta caa cag 240
 His Met Asn Val His Arg Arg Asp Arg Ala Arg Leu Arg Leu Gln Gln
 65 70 75 80
 tct cca tca tca tct tca aca cct tct cct cct tac cct aac cct aat 248
 Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Pro Ser Pro Pro Tyr Pro Asn Pro Asn
 85 90 95
 tac tct tac tca acc atg gca aac tct cct cct cct cat cat tct cct 296
 Tyr Ser Tyr Ser Thr Met Ala Asn Ser Pro Pro Pro His His Ser Pro
 100 105 110
 cta acc cta ttt cca acc ctt tct cct cca tcc tca cca aga tat agg 344
 Leu Thr Leu Phe Pro Thr Leu Ser Pro Pro Ser Ser Pro Arg Tyr Arg
 115 120 125
 gca ggt ttg atc cgt tcc ttg agc ccc aag tca aaa cat aca cca gaa 392
 Ala Gly Leu Ile Arg Ser Leu Ser Pro Lys Ser Lys His Thr Pro Glu
 130 135 140
 aac gct tgt aag act aag aaa tca tct ctt tta gtg gag gct gga gag 440
 Asn Ala Cys Lys Thr Lys Lys Ser Ser Leu Leu Val Glu Ala Gly Glu

145 150 155 160
gct aca agg ttc acc agt aaa gat gct tgc aag atc ctg agg aat gat 488
Ala Thr Arg Phe Thr Ser Lys Asp Ala Cys Lys Ile Leu Arg Asn Asp
 165 170 175
gaa atc atc agc ttg gag ctt gag att ggt ttg att aac gaa tca gag 582
Glu Ile Ile Ser Leu Glu Leu Glu Ile Gly Leu Ile Asn Glu Ser Glu
 180 185 190
caa gat ctg gat cta gaa ctc cgt ttg ggt ttc gct taa 611
Leu Gly Phe Ala Gln Asp Leu Asp Leu Glu Leu Arg
 195 200

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 32

gaatgatgaa atcatcag

<210> 33

<211> 29

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 33

catggcgact cctaacgaag tatctgcac

<210> 34

<211> 39

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 34

atcgttcaaa aactcaaggc taactaatca acaacggtc

<210> 35

<211> 65

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 35

agcttagatc tgcaagaccc ttcctctata taaggaagtt catttcattt ggagaggaca 60
cgctg

<210> 36

<211> 65

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 36

gatccagcgt gtcctctcca aatgaaatga acttccttat atagaggaag ggtcttgcag 60
atcta

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 37

cgccagggtt ttcccagtcg cgac

<210> 38

<211> 37

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 38

aagggttaagc ttaaggatag tgggattgtg cgtcatc

<210> 39

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 39

gatcagccgc cgatcagccg ccgatcagcc gccgatcagc cgcc

<210> 40

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 40

tcggccggct agtcggcggc tagtcggcgg ctagtcggcg ggatc

<210> 41

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 41

gatccacaat taccaacaac aacaaacaac aaacaacatt acaattacag atcccggggg 60

taccgtcgac gagctc

<210> 42

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 42

cgtcgacggt acccccgga tctgtaattg taatgttgtt tgttgtttgt tgttgttgtt 60
ggtaattgtg

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 43

aatgatgttt aatgagatgg g

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 44

atgaatcccc gggatattat tc

<210> 45

<211> 19

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 45

cgacactgca gatcacaac

<210> 46

<211> 30

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 46

atcccgaacc atatggatac atcttgctgc

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 47

agtgggtcct actgtgtcgg actc

<211> 48

<212> 39

<213> DNA

<400> 48

ccaaataaca ttatcgggtcg actcaaaatt ccataggtg

<210> 49

<211> 35

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 22

Val Gly Pro Thr Val Ser Asp Ser Ser Ser Ala Val Glu Glu Asn

1 5 10 15

Gly Tyr Asp Gly Lys Arg Asp Ile Ala Leu Ala Lue Asn Lue Ala

20 25 30

Pro Pro Met Glu Phe

35

<210> 50

<211> 111

<212> DNA

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 50

agtgggtcct actgtgtcgg actcgtcctc tgcagtggaa gagaaccaat atgatgggga 60
aaagaggaat tgatcttgat cttaaccttg ctccacctat ggaattttga g

<210> 51

<211> 116

<212> DNA

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 51

tgcactcaaa attccatagg tggagcaagg ttaagatcaa gatcaattcc tcttttcccc 60
catcatattg gttctcttcc actgcagagg acgagtcoga cacagtagga cccact

<210> 52

<211> 1887

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)(1887)

<223>

<300>

<301>

Chao,Q., Rothenberg,M., Solano,R., Roman,G., Terzaghi,W. and Ecker,J.R.

<302>

Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins

<303> Cell

<304> 89

<305> (7)

<306> 1133-1144

<307> (1997)

<308> AF004216

<400> 52

```

atg atg ttt aat gag atg gga atg tgt gga aac atg gat ttc ttc tct 48
Met Met Phe Asn Glu Met Gly Met Cys Gly Asn Met Asp Phe Phe Ser
  1              5              10              15
tct gga tca ctt ggt gaa gtt gat ttc tgt cct gtt cca caa gct gag 96
Ser Gly Ser Leu Gly Glu Val Asp Phe Cys Pro Val Pro Gln Ala Glu
      20              25              30
cct gat tcc att gtt gaa gat gac tat act gat gat gag att gat gtt 144
Pro Asp Ser Ile Val Glu Asp Asp Tyr Thr Asp Asp Glu Ile Asp Val
      35              40              45
gat gaa ttg gag agg agg atg tgg aga gac aaa atg cgg ctt aaa cgt 192
Asp Glu Leu Glu Arg Arg Met Trp Arg Asp Lys Met Arg Leu Lys Arg
      50              55              60
ctc aag gag cag gat aag ggt aaa gaa ggt gtt gat gct gct aaa cag 240
Leu Lys Glu Gln Asp Lys Gly Lys Glu Gly Val Asp Ala Ala Lys Gln
      65              70              75              80
agg cag tct caa gag caa gct agg agg aag aaa atg tct aga gct caa 288
Arg Gln Ser Gln Glu Gln Ala Arg Arg Lys Lys Met Ser Arg Ala Gln
      85              90              95
gat ggg atc ttg aag tat atg ttg aag atg atg gaa gtt tgt aaa gct 336
Asp Gly Ile Leu Lys Tyr Met Leu Lys Met Met Glu Val Cys Lys Ala

```

100 105 110
 caa ggc ttt gtt tat ggg att att ccg gag aat ggg aag cct gtg act 384
 Gln Gly Phe Val Tyr Gly Ile Ile Pro Glu Asn Gly Lys Pro Val Thr
 115 120 125
 ggt gct tct gat aat tta agg gag tgg tgg aaa gat aag gtt agg ttt 432
 Gly Ala Ser Asp Asn Leu Arg Glu Trp Trp Lys Asp Lys Val Arg Phe
 130 135 140
 gat cgt aat ggt cct gcg gct att acc aag tat caa gcg gag aat aat 480
 Asp Arg Asn Gly Pro Ala Ala Ile Thr Lys Tyr Gln Ala Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 atc ccg ggg att cat gaa ggt aat aac ccg att gga ccg act cct cat 528
 Ile Pro Gly Ile His Glu Gly Asn Asn Pro Ile Gly Pro Thr Pro His
 165 170 175
 acc ttg caa gag ctt caa gac acg act ctt gga tcg ctt ttg tct gcg 576
 Thr Leu Gln Glu Leu Gln Asp Thr Thr Leu Gly Ser Leu Leu Ser Ala
 180 185 190
 ttg atg caa cac tgt gat cct cct cag aga cgt ttt cct ttg gag aaa 624
 Leu Met Gln His Cys Asp Pro Pro Gln Arg Arg Phe Pro Leu Glu Lys
 195 200 205
 gga gtt cct cct ccg tgg tgg cct aat ggg aaa gag gat tgg tgg cct 672
 Gly Val Pro Pro Pro Trp Trp Pro Asn Gly Lys Glu Asp Trp Trp Pro
 210 215 220
 caa ctt ggt ttg cct aaa gat caa ggt cct gca cct tac aag aag cct 720
 Gln Leu Gly Leu Pro Lys Asp Gln Gly Pro Ala Pro Tyr Lys Lys Pro
 225 230 235 240
 cat gat ttg aag aag gcg tgg aaa gtc ggc gtt ttg act gcg gtt atc 768
 His Asp Leu Lys Lys Ala Trp Lys Val Gly Val Leu Thr Ala Val Ile
 245 250 255
 aag cat atg ttt cct gat att gct aag atc cgt aag ctc gtg agg caa 816

Lys His Met Phe Pro Asp Ile Ala Lys Ile Arg Lys Leu Val Arg Gln

260

265

270

tct aaa tgt ttg cag gat aag atg act gct aaa gag agt gct acc tgg 864

Ser Lys Cys Leu Gln Asp Lys Met Thr Ala Lys Glu Ser Ala Thr Trp

275

280

285

ctt gct att att aac caa gaa gag tcc ttg gct aga gag ctt tat ccc 912

Leu Ala Ile Ile Asn Gln Glu Glu Ser Leu Ala Arg Glu Leu Tyr Pro

290

295

300

gag tca tgt cca cct ctt tct ctg tct ggt gga agt tgc tcg ctt ctg 960

Glu Ser Cys Pro Pro Leu Ser Leu Ser Gly Gly Ser Cys Ser Leu Leu

305

310

315

320

atg aat gat tgc agt caa tac gat gtt gaa ggt ttc gag aag gag tct 1008

Met Asn Asp Cys Ser Gln Tyr Asp Val Glu Gly Phe Glu Lys Glu Ser

325

330

335

cac tat gaa gtg gaa gag ctc aag cca gaa aaa gtt atg aat tct tca 1056

His Tyr Glu Val Glu Glu Leu Lys Pro Glu Lys Val Met Asn Ser Ser

340

345

350

aac ttt ggg atg gtt gct aaa atg cat gac ttt cct gtc aaa gaa gaa 1104

Asn Phe Gly Met Val Ala Lys Met His Asp Phe Pro Val Lys Glu Glu

355

360

365

gtc cca gca gga aac tcg gaa ttc atg aga aag aga aag cca aac aga 1152

Val Pro Ala Gly Asn Ser Glu Phe Met Arg Lys Arg Lys Pro Asn Arg

370

375

380

gat ctg aac act att atg gac aga acc gtt ttc acc tgc gag aat ctt 1200

Asp Leu Asn Thr Ile Met Asp Arg Thr Val Phe Thr Cys Glu Asn Leu

385

390

395

400

ggg tgt gcg cac agc gaa atc agc cgg gga ttt ctg gat agg aat tcg 1248

Gly Cys Ala His Ser Glu Ile Ser Arg Gly Phe Leu Asp Arg Asn Ser

405

410

415

aga gac aac cat caa ctg gca tgt cca cat cga gac agt cgc tta ccg 1296

Arg Asp Asn His Gln Leu Ala Cys Pro His Arg Asp Ser Arg Leu Pro

420

425

430

tat gga gca gca cca tcc agg ttt cat gtc aat gaa gtt aag cct gta 1344

Tyr Gly Ala Ala Pro Ser Arg Phe His Val Asn Glu Val Lys Pro Val

435

440

445

gtt gga ttt cct cag cca agg cca gtg aac tca gta gcc caa cca att 1392

Val Gly Phe Pro Gln Pro Arg Pro Val Asn Ser Val Ala Gln Pro Ile

450

455

460

gac tta acg ggt ata gtt cct gaa gat gga cag aag atg atc tca gag 1440

Asp Leu Thr Gly Ile Val Pro Glu Asp Gly Gln Lys Met Ile Ser Glu

465

470

475

480

ctc atg tcc atg tac gac aga aat gtc cag agc aac caa acc tct atg 1488

Leu Met Ser Met Tyr Asp Arg Asn Val Gln Ser Asn Gln Thr Ser Met

485

490

495

gtc atg gaa aat caa agc gtg tca ctg ctt caa ccc aca gtc cat aac 1536

Val Met Glu Asn Gln Ser Val Ser Leu Leu Gln Pro Thr Val His Asn

500

505

510

cat caa gaa cat ctc cag ttc cca gga aac atg gtg gaa gga agt ttc 1584

His Gln Glu His Leu Gln Phe Pro Gly Asn Met Val Glu Gly Ser Phe

515

520

525

ttt gaa gac ttg aac atc cca aac aga gca aac aac aac aac agc agc 1632

Phe Glu Asp Leu Asn Ile Pro Asn Arg Ala Asn Asn Asn Asn Ser Ser

530

535

540

aac aat caa acg ttt ttt caa ggg aac aac aac aac aac aat gtg ttt 1696

Asn Asn Gln Thr Phe Phe Gln Gly Asn Asn Asn Asn Asn Asn Val Phe

545

550

555

560

aag ttc gac act gca gat cac aac aac ttt gaa gct gca cat aac aac 1728

Lys Phe Asp Thr Ala Asp His Asn Asn Phe Glu Ala Ala His Asn Asn

565

570

575

aac aat aac agt agc ggc aac agg ttc cag ctt gtg ttt gat tcc aca 1776

Asn Asn Asn Ser Ser Gly Asn Arg Phe Gln Leu Val Phe Asp Ser Thr

580

585

590

ccg ttc gac atg gcg tca ttc gat tac aga gat gat atg tcg atg cca 1824

Pro Phe Asp Met Ala Ser Phe Asp Tyr Arg Asp Asp Met Ser Met Pro

595

600

605

gga gta gta gga acg atg gat gga atg cag cag aag cag caa gat gta 1872

Gly Val Val Gly Thr Met Asp Gly Met Gln Gln Lys Gln Gln Asp Val

610

615

620

tcc ata tgg ttc taa

1887

Ser Ile Trp Phe

625

<210> 53

<211> 678

<212> DNA, PRT

<213> *Nicotiana tabacum*

<220>

<221> CDS

<222> (1) (678)

<223>

<300>

<301> Ohme-Takagi, M. and Shinshi, H.

<302>

Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element

<303> Plant Cell

<304> 7

<305> (2)

<306> 173-182

<307> 1995

<308> D38124

<400> 53

atg gct gtc aaa aat aag gtt agt aat ggc aat ctg aaa gga gga aat 48
 Met Ala Val Lys Asn Lys Val Ser Asn Gly Asn Leu Lys Gly Gly Asn
 1 5 10 15
 gtg aaa aca gat gga gtt aag gag gtt cac tac aga ggt gta agg aag 96
 Val Lys Thr Asp Gly Val Lys Glu Val His Tyr Arg Gly Val Arg Lys
 20 25 30
 agg cca tgg ggt cgg tat gca gct gaa atc cgt gac ccg ggt aag aag 144
 Arg Pro Trp Gly Arg Tyr Ala Ala Glu Ile Arg Asp Pro Gly Lys Lys
 35 40 45
 agt cgg gtc tgg tta ggt act ttc gac acg gcg gaa gag gcg gct aag 192
 Ser Arg Val Trp Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Glu Glu Ala Ala Lys
 50 55 60
 gcg tac gac acc gcc gct cga gag ttt cgt gga ccc aaa gca aaa act 240
 Ala Tyr Asp Thr Ala Ala Arg Glu Phe Arg Gly Pro Lys Ala Lys Thr
 65 70 75 80
 aac ttc cct tca ccg acg gag aat cag agc cca agt cac agc agc acc 288
 Asn Phe Pro Ser Pro Thr Glu Asn Gln Ser Pro Ser His Ser Ser Thr
 85 90 95
 gtg gag tcc tct agt gga gag aat ggt gtt cac gcg ccg cct cat gcg 336
 Val Glu Ser Ser Ser Gly Glu Asn Gly Val His Ala Pro Pro His Ala
 100 105 110
 ccg ctc gag ctg gat ctc acg cgc cgt ctt ggc tcc gtt gct gca gat 384
 Pro Leu Glu Leu Asp Leu Thr Arg Arg Leu Gly Ser Val Ala Ala Asp
 115 120 125

ggc ggt gac aac tgt cgc cgt tct ggg gaa gtt ggg tac ccg att ttc 432
 Gly Gly Asp Asn Cys Arg Arg Ser Gly Glu Val Gly Tyr Pro Ile Phe
 130 135 140
 cac cag cag ccg act gtg gcg gtt ctg cca aat ggc cag ccg gtt ctg 480
 His Gln Gln Pro Thr Val Ala Val Leu Pro Asn Gly Gln Pro Val Leu
 145 150 155 160
 ctc ttt gat tct ttg tgg cgg gcg gga gtt gtt aac agg cct cag cct 528
 Leu Phe Asp Ser Leu Trp Arg Ala Gly Val Val Asn Arg Pro Gln Pro
 165 170 175
 tac cat gta acg ccg atg ggg ttt aac ggc gtt aac gcc gga gtg ggt 576
 Tyr His Val Thr Pro Met Gly Phe Asn Gly Val Asn Ala Gly Val Gly
 180 185 190
 cct act gtg tcg gac tcg tcc tct gca gtg gaa gag aac caa tat gat 624
 Pro Thr Val Ser Asp Ser Ser Ser Ala Val Glu Glu Asn Gln Tyr Asp
 195 200 205
 ggg aaa aga gga att gat ctt gat ctt aac ctt gct cca cct atg gaa 672
 Gly Lys Arg Gly Ile Asp Leu Asp Leu Asn Leu Ala Pro Pro Met Glu
 210 220 225
 ttt tga 678
 Phe

【図面の簡単な説明】

【図 1】 試験対象の各種 DNA 断片を含む GALDB エフェクター スミドを構築する手順を示す図である。

【図 2】 レポーター遺伝子 p35S-GAL4-LUC を構築する手順の前半部を示す図である。

【図 3】 上記レポーター遺伝子 p35S-GAL4-LUC を構築する手順の後半部を示す図である。

【図 4】 A は、レポーター遺伝子とエフェクター プラスミドを示す図である。な

お、図中、5XGAL4: GAL4転写因子DNA結合配列、TATA: CaMV35SプロモーターTATAボックスを含む領域、LUC: ルシフェラーゼ遺伝子、CaMV 35S: カリフラワーモザイクウイルス35Sタンパク質遺伝子プロモーター、GAL4 DB: 酵母GAL4転写因子DNA結合ドメインコード領域、Nos: ノパリン合成酵素遺伝子転写終止領域を表す。

Bは、pGALDBに結合したペプチドがリポーター遺伝子の活性(Relative Activity)に及ぼす影響を示す図である。図中、右側のグラフは、各種DNA断片を有するエフェクタープラスミドを導入したときのリポーター遺伝子の活性を示す。(エフェクターを入れないときのリポーター遺伝子の活性を100とした。)

【図5】エフェクタープラスミドpGALDB-SUPの構築手順を示す図である。

【図6】エフェクタープラスミドpAtERF5の構築手順を示す図である。

【図7】レポータープラスミドp35S-GAL4-LUCの構築手順の前半部を示す図である。

【図8】レポータープラスミドp35S-GAL4-LUCの構築手順の後半部を示す図である。

【図9】レポータープラスミドpGAL4-GCC-LUCの構築手順の前半部を示す図である。

【図10】レポータープラスミドpGAL4-GCC-LUCの構築手順の前半部を示す図である。

【図11】転写抑制試験においてAは、レポーターとしてプラスミドに組み込まれた35S-GAL4-LUCの構造及び同エフェクター遺伝子として組み込まれたSUP(D)の構造の概略を示す図であり、同BはSUP遺伝子及びその断片等による転写抑制試験の結果を示す図である。

【図12】転写抑制試験においてAは、レポーターとして使用したGAL4-GCC-LUCの構造、及びAtERF5、GAL4DB、SUPfull、SUP175/204を組み込んで構築されたエフェクター遺伝子の構造の概略を示す図であり、同Bは各エフェクターによる転写抑制試験の結果を示す図である。

【図13】SUP遺伝子によるEIN3の転写活性化機能の抑制効果を、エチレン前駆体存在下における植物体の茎長、根の伸長程度により調べた結果を示す写真である。

【図 1 4】 SUP遺伝子及びERF3遺伝子による植物体におけるEIN3の転写活性化機能の抑制効果を エチレン存在下における植物体成長の程度により調べた結果を示す写真である。

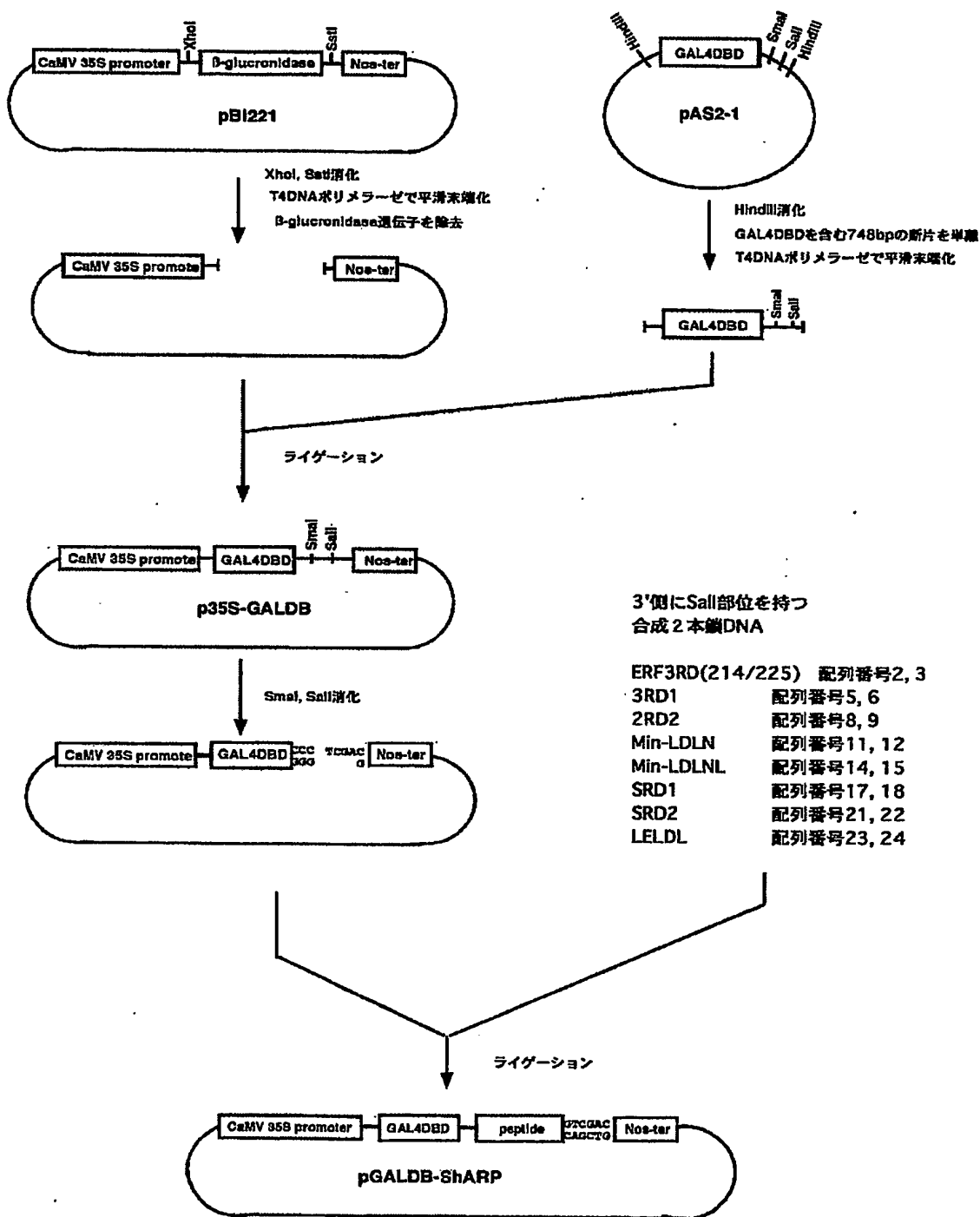
【図 1 5】 SUP遺伝子及びERF3遺伝子による、エチレン存在下でのPDF1.2、BCHN及びERF1遺伝子の発現抑制効果を、これらエチレン誘導性遺伝子の発現を示すmRNAの検出の有無を指標にノーザンブロットハイブリダイゼーションにより調べた結果を示す写真である。

【図 1 6】 ERF3遺伝子によるEIN3の転写活性化機能の抑制効果を、エチレン前駆体存在下における植物体の茎長、根の伸長程度により調べた結果を示す写真である。

【書類名】 図面

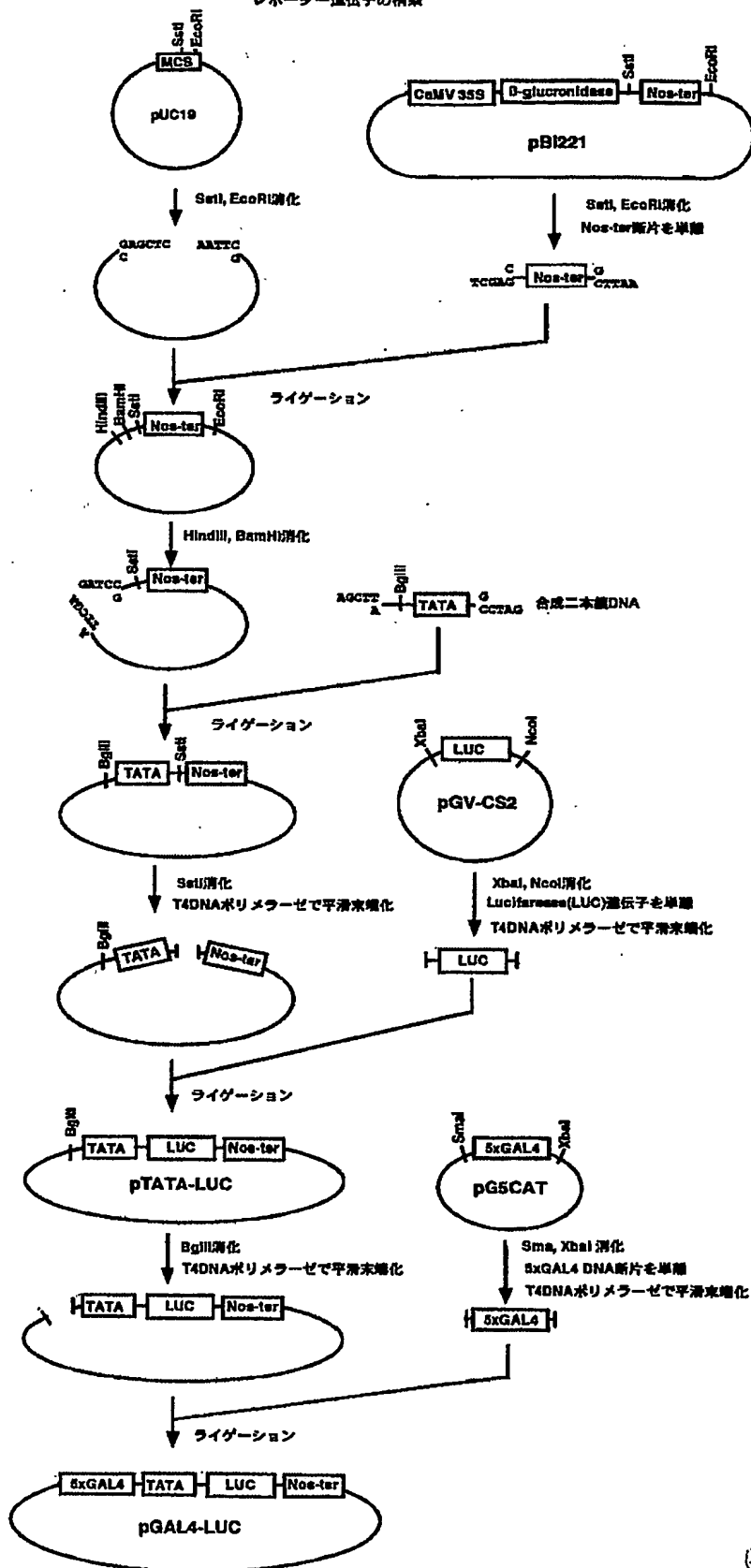
【図 1】

エフェクタープラスミドの構築

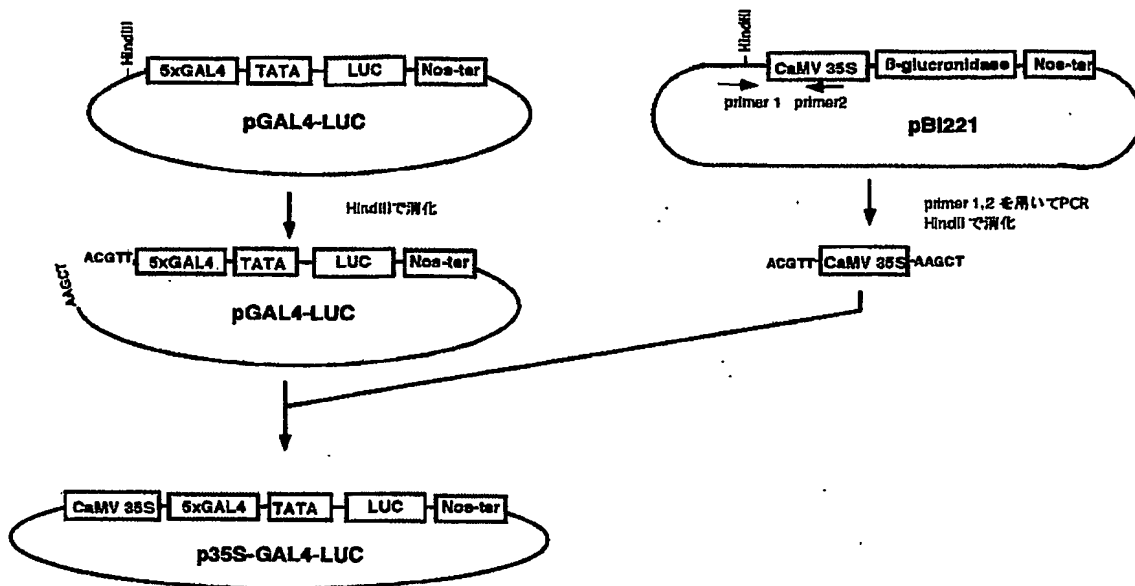


【図 2】

レポーター遺伝子の構築

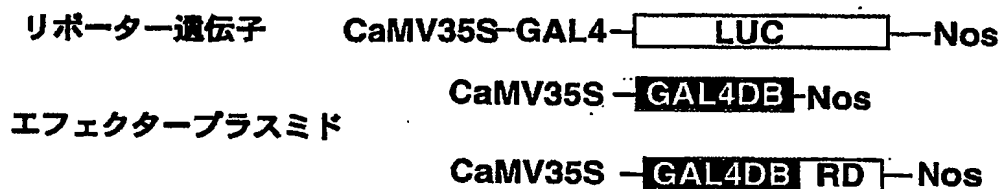


【図 3】

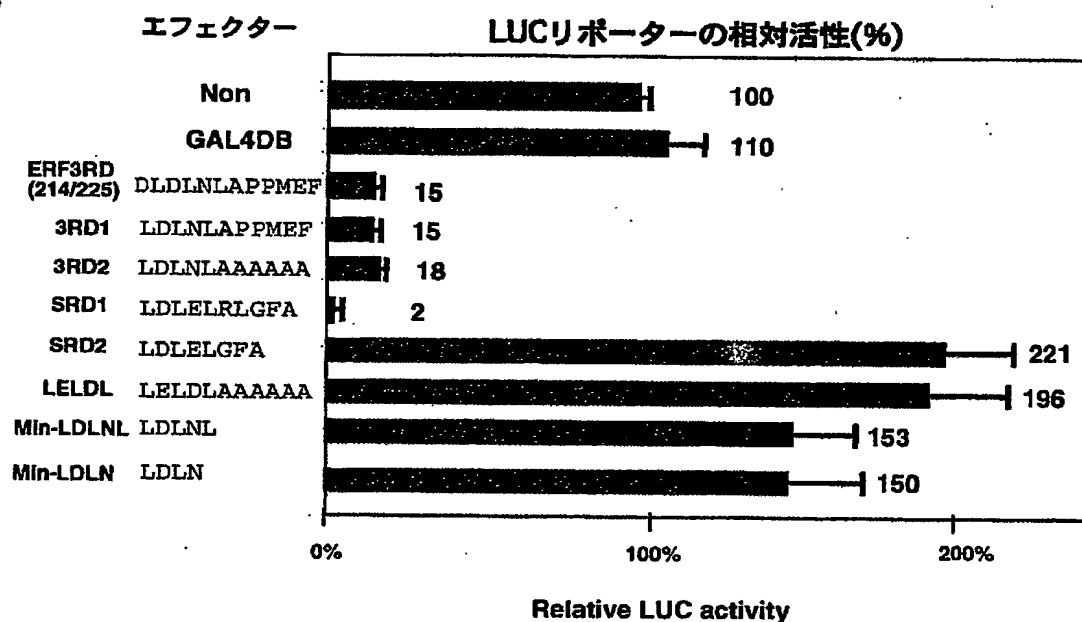


【図 4】

A



B



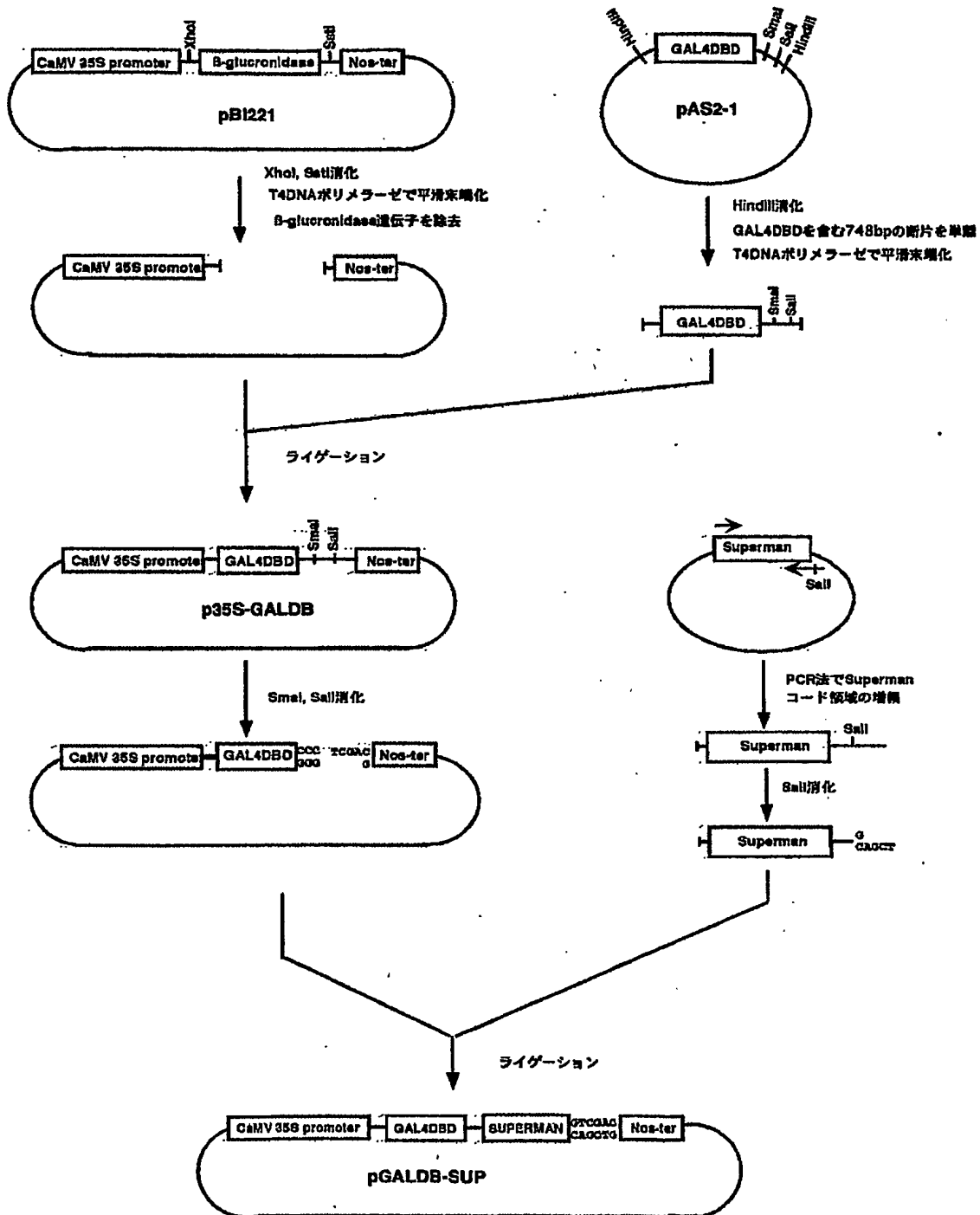
転写抑制機能ペプチド

DLNLNLAAPPMEF
 LDNLNLAAPPMEF
 LDNLNLAAPAAAA
 LDLELRGFA

共通配列 LDNLN/ELXXXXX

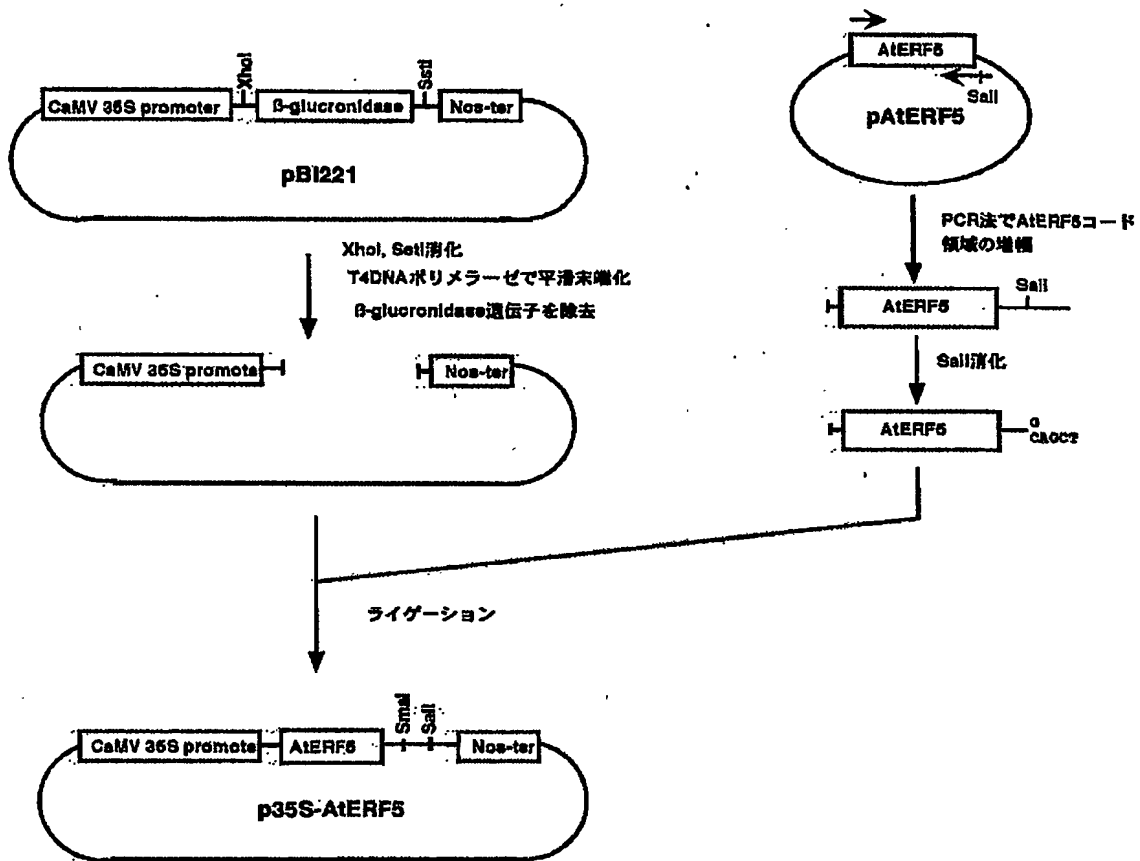
【図 5】

エフェクタープラスミドの構築



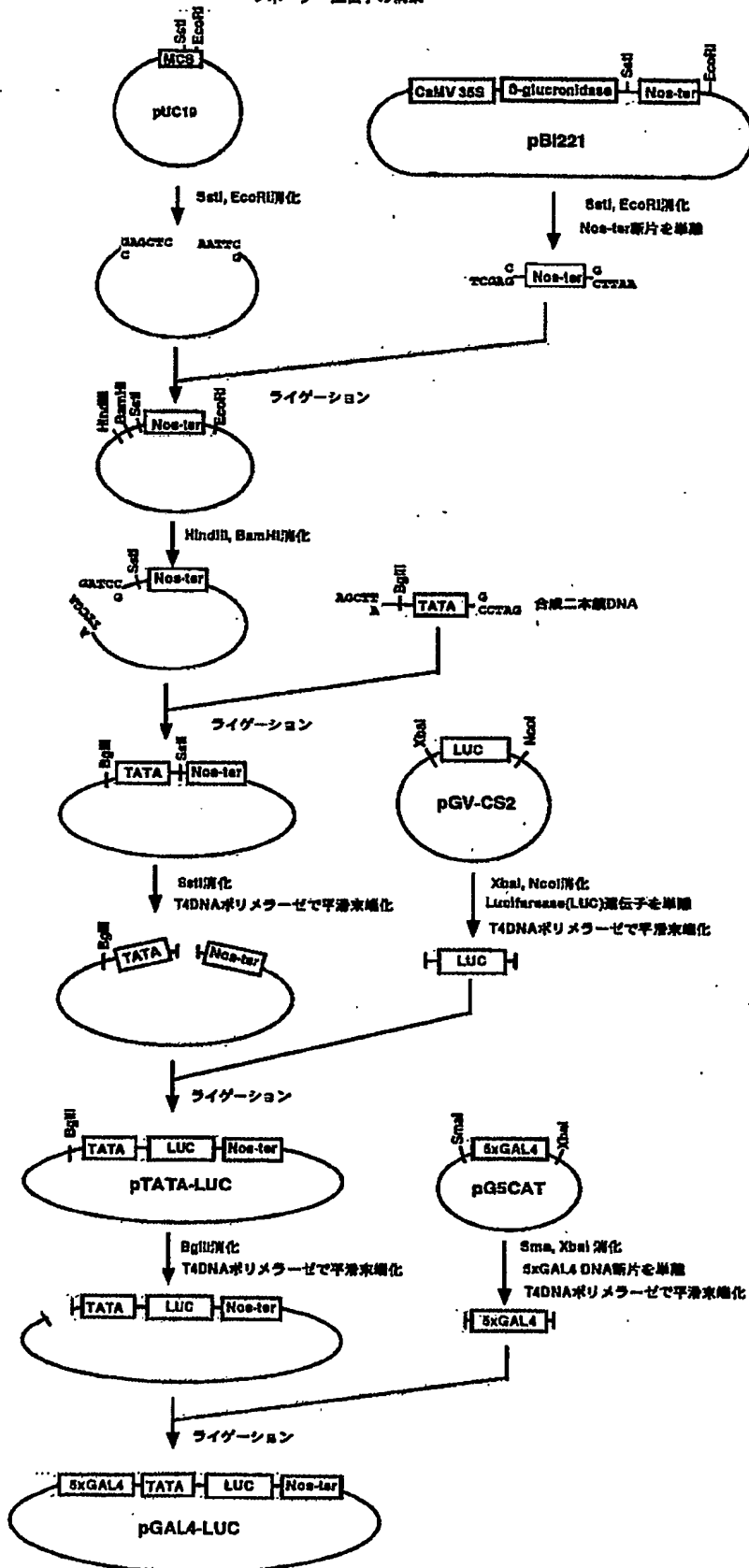
【図 6】

エフェクタープラスミドの構築

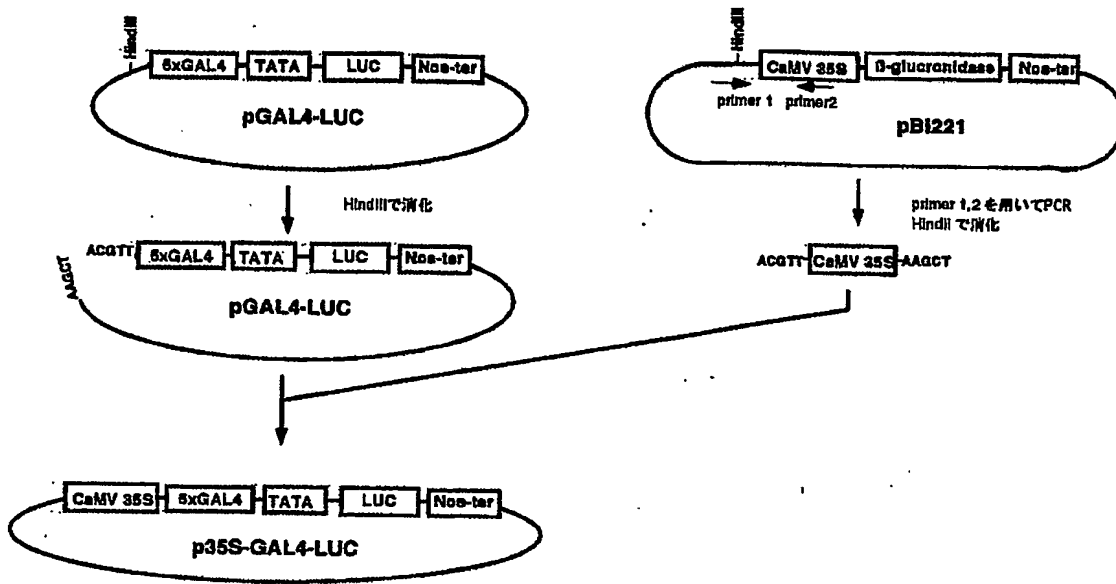


【図 7】

レポーター遺伝子の構築

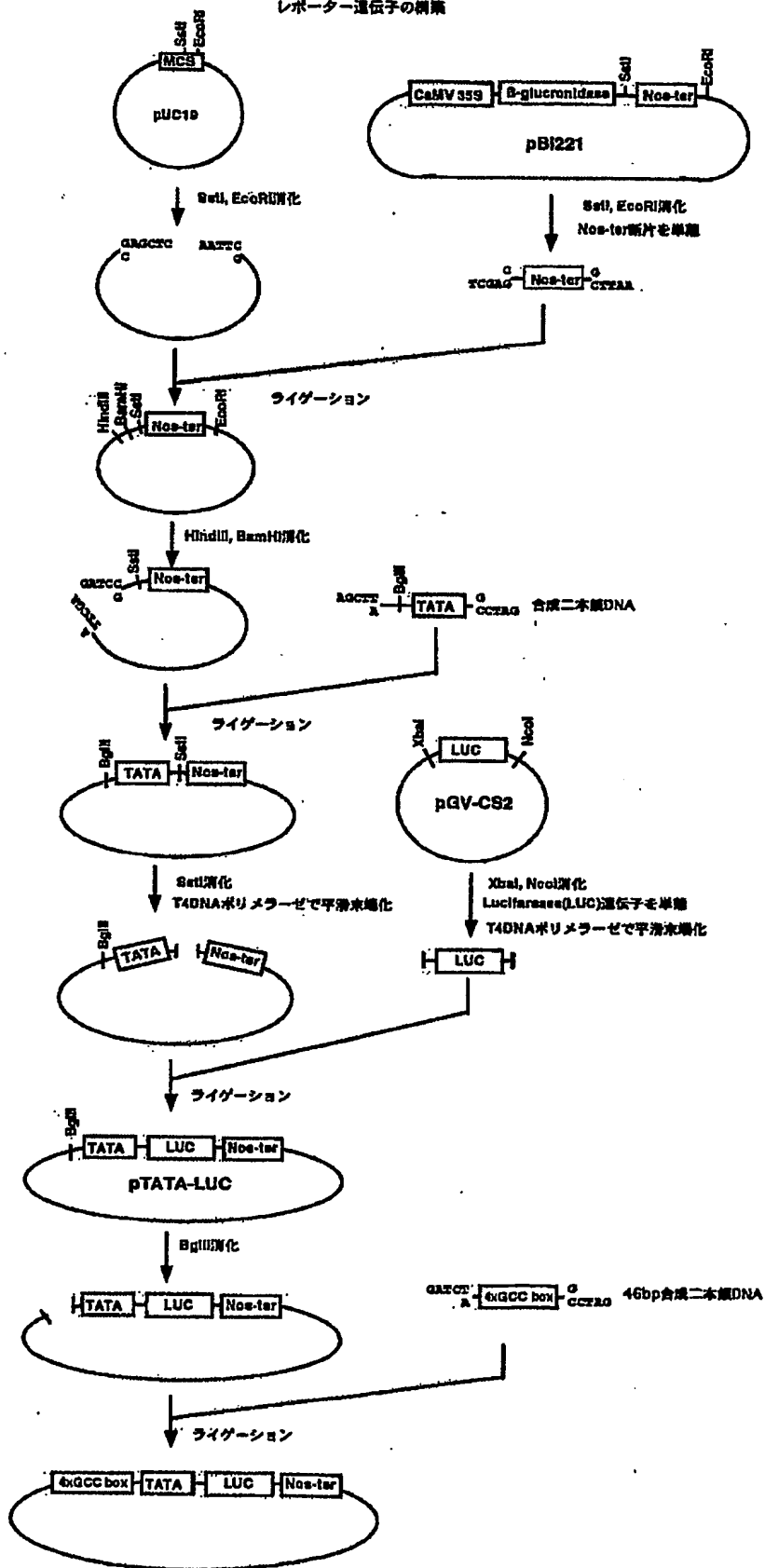


【図 8】

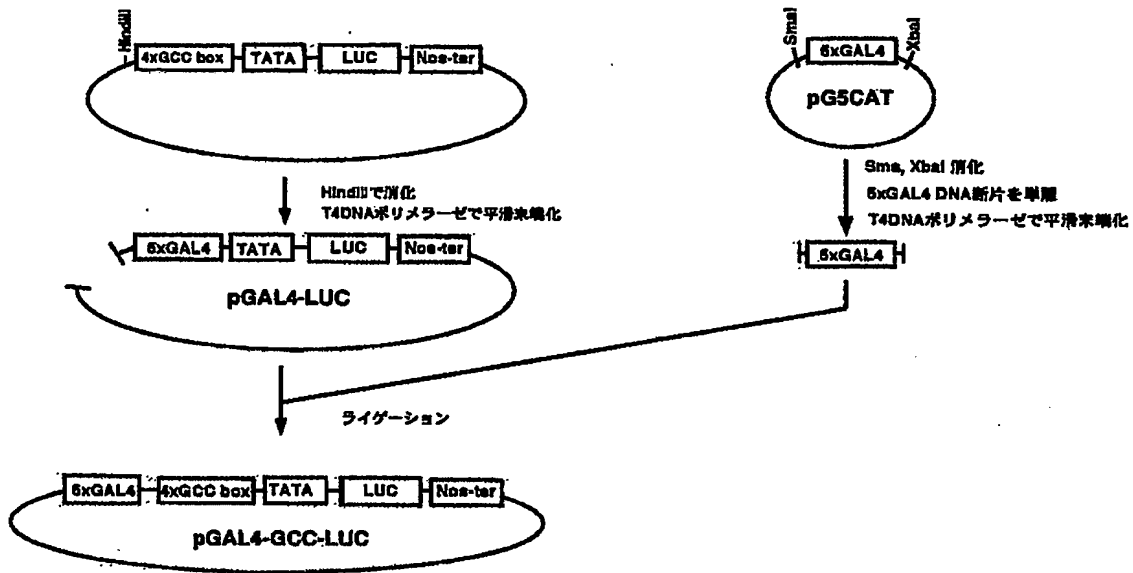


【図 9】

レポーター遺伝子の構築



【図10】



【 1 1 】

A

Reporter
35S-GAL4-LUC CaMV35S' - 5XGAL4 - 'TATA' - LUC - Nos

Effector
SUP(D) CaMV35S - Ω - GAL4DB - SUP(D) - Nos

B

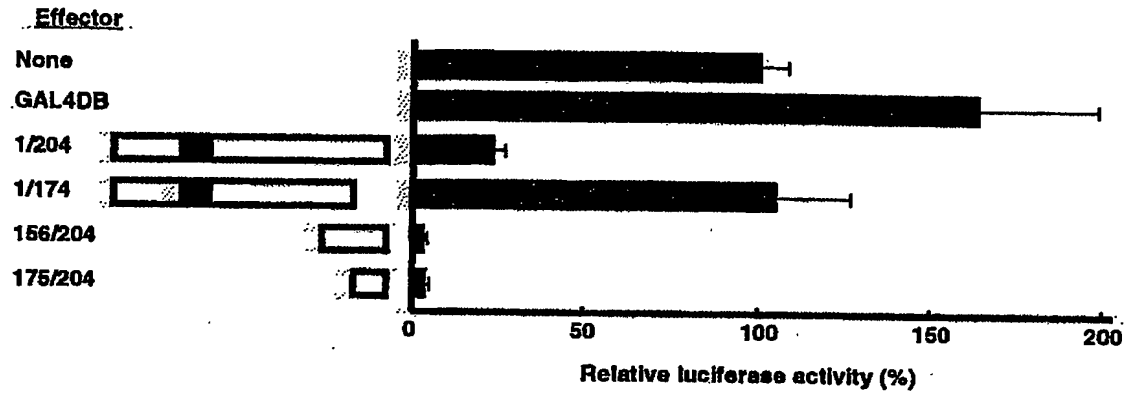
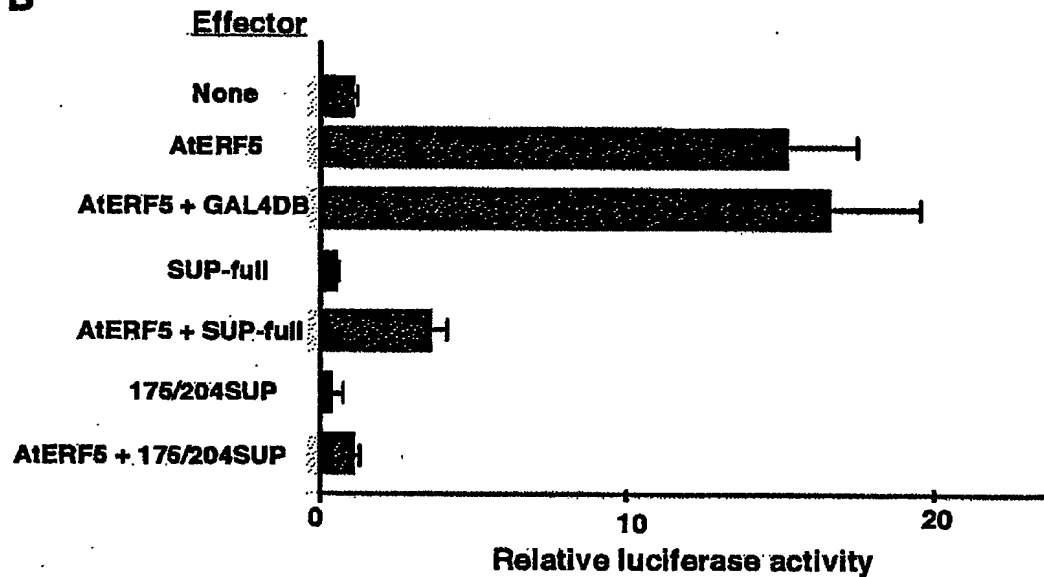


Fig. 2 Ohme-Takagi, M

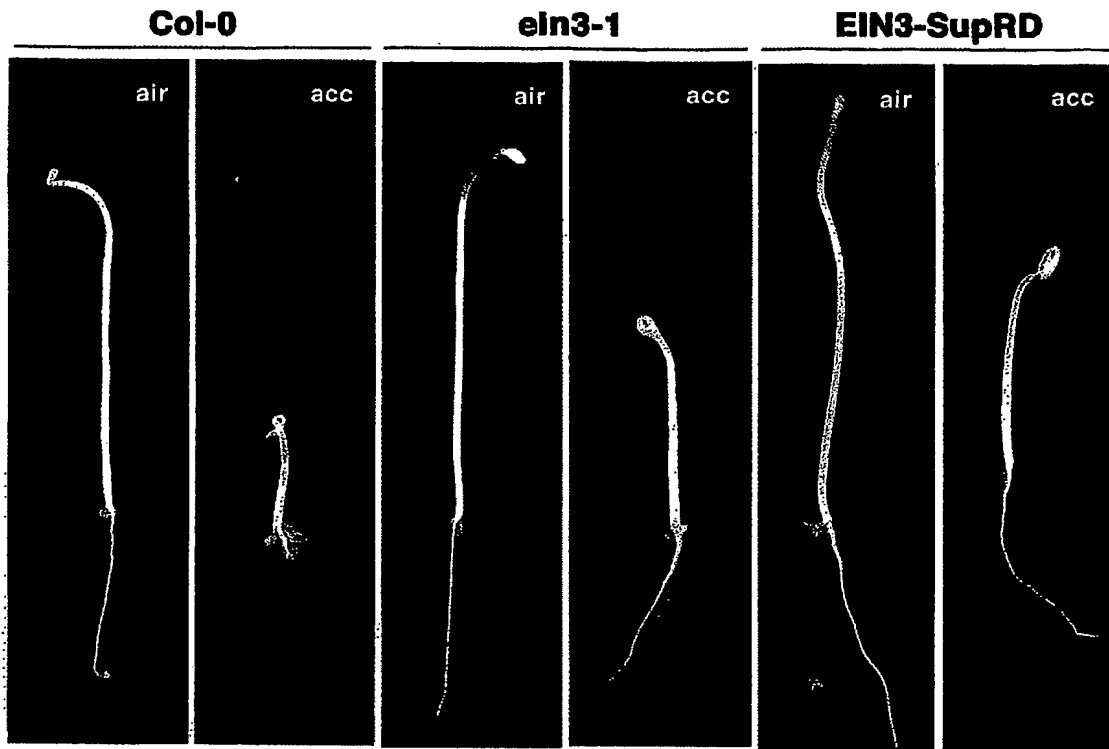
【図 12】

A

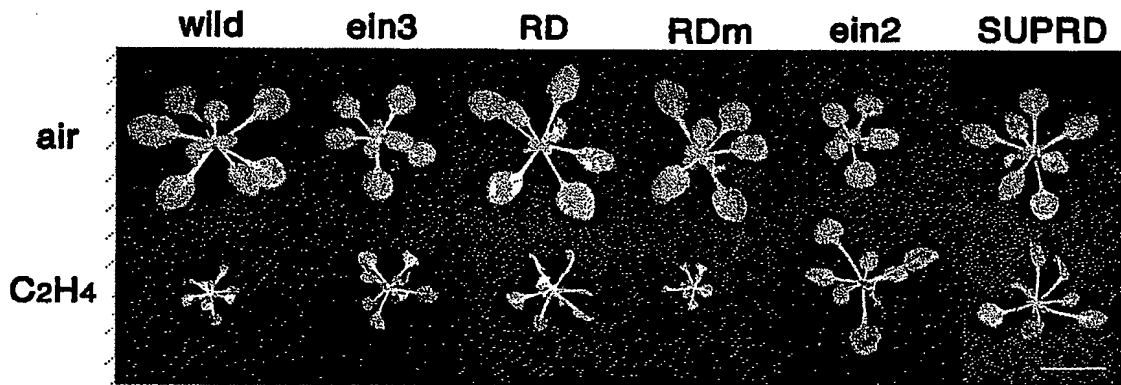
Reporter	
GAL4GCC-LUC	5 × GAL4-4 × GCC-TATA-LUC-Nos
Effector	
AtERF5	CaMV35S-Ω-AtERF5-Nos
GAL4DB	CaMV35S-Ω-GAL4DB-Nos
GAL4DB-SUP	CaMV35S-Ω-GAL4DB 1/204SUP-Nos
GAL4DB-175/204SUP	CaMV35S-Ω-GAL4DB 174/204SUP-Nos

B

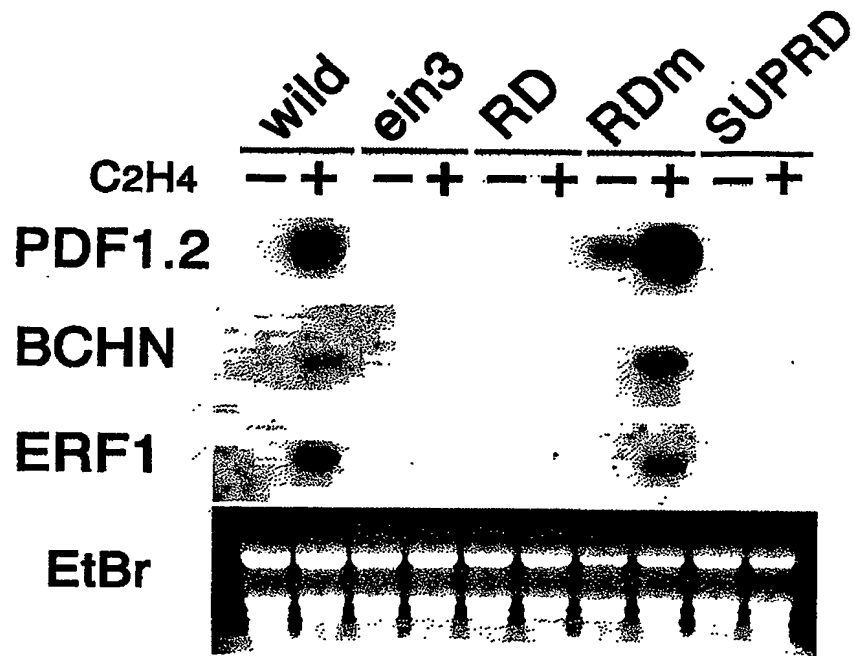
【図 1 3】



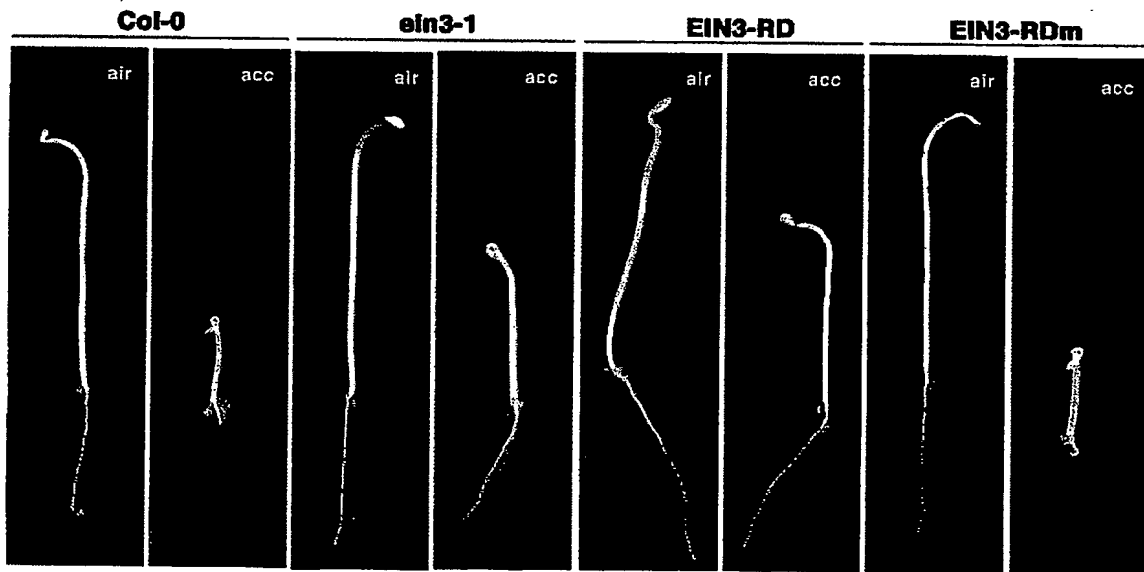
【図 1 4】



【図 1.5】



【図 1 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アンチセンス法あるいはリボザイム法等にみられる標的遺伝子の塩基配列に合わせて、その都度DNAあるいはRNAの設計を行う必要なく、簡便でかつ広く適用可能な遺伝子の転写抑制手段を提供する

【解決手段】 $X - \text{Leu} - \text{Asp} - \text{Leu} - \text{Y} - \text{Leu} - \text{Z} \cdots (\text{I})$

(但し式中、Xは0～10個のアミノ酸残基を表し、Yはアスパラギンまたはグルタミン酸を表し、Zは少なくとも5個のアミノ酸残基を表す。)をコードする遺伝子と転写因子をコードする遺伝子とを連結せしめたキメラ遺伝子あるいはその産物であるキメラタンパク質を用いて、上記転写因子のDNA結合ドメインと結合する遺伝子の転写を抑制する。

【選択図】 なし

認 定 ・ 付 加 情 報

特許出願の番号	特願 2 0 0 1 - 3 9 5 4 8 7
受付番号	5 0 1 0 1 9 0 6 6 6 3
書類名	特許願
担当官	松田 伊都子 8 9 0 1
作成日	平成 1 4 年 1 月 8 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成13年12月26日

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [301021533]

1. 変更年月日	2001年 4月 2日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関1-3-1
氏 名	独立行政法人産業技術総合研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.